

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Maurice HOLDERER

Ingénieur des Arts et Manufactures,
Attaché à l'Institut Pasteur

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LA FILTRATION DES DIASTASES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 16 juin 1911 devant la Commission d'Examen.

MM. Gabriel BERTRAND,	<i>Président.</i>
Jean PERRIN,	} <i>Examineurs.</i>
A. FERNBACH,	

PARIS

IMP. BUTTNER-THIERRY

34, Rue Laffitte.

1911



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Maurice HOLDERER

Ingénieur des Arts et Manufactures,
Attaché à l'Institut Pasteur

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LA FILTRATION DES DIASTASES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 16 juin 1911 devant la Commission d'Examen.



MM. Gabriel BERTRAND,	<i>Président.</i>
Jean PERRIN,	} <i>Examineurs.</i>
A. FERNBACH,	

PARIS

IMP. BUTTNER - THIERRY

34, Rue Laffitte.

1911

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen P. APPELL, *Professeur*. Mécanique rationnelle,

Doyen honoraire . . . G. DARBOUX, — Géométrie supérieure.

Professeurs honoraires. { L. TROST.
Ch. WOLF.
J. RIBAN.

	LIPPMANN	Physique.
	BOUTY	Physique.
	BOUSSINESQ	Physique mathém. et calcul des probabilités
	PICARD	Analyse supérieure et algèbre supérieure.
	H. POINCARÉ	Astronomie mathém. et mécanique céleste.
	Y. DELAGE	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
	G. BONNIER	Botanique.
	DASTRE	Physiologie.
	KENIGS	Mécanique physique et expérimentale.
	VÉLAIN	Géographie physique.
	GOURSAT	Calcul différentiel et calcul intégral.
	CHATIN	Histologie.
	HALLER	Chimie organique.
	JOANNIS	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET	Physique.
	WALLERANT	Minéralogie.
<i>Professeurs</i>	ANDOYER	Astronomie physique.
	PAINLEVÉ	Mathématiques générales.
	HAUG	Géologie.
	TANNERY	Calcul différentiel et calcul intégral.
	RAFFY	Application de l'analyse à la géométrie.
	HOUSSAY	Zoologie.
	H. LE CHATELIER	Chimie.
	Gabriel BERTRAND	Chimie biologique.
	M ^{me} P. CURIE	Physique générale.
	CAULLERY	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
	C. CHABRIÉ	Chimie appliquée.
	G. URBAIN	Chimie.
	BOREL	Théorie des fonctions.
	MARCHIS	Aviation.
	Jean PERRIN	Chimie physique.
	G. PRUVOT	Anatomie comparée.
	N.	Physique.
	N.	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.

	PUISEUX	Mécanique et astronomie.
	LEDUC	Physique.
	MATRUCHOT	Botanique.
	MICHEL	Minéralogie.
<i>Professeurs-adjoints</i>	HÉROUARD	Zoologie.
	Léon BERTRAND	Géologie.
	Rémy PERRIER	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
	MOLLIARD	Physiologie végétale.
	COTTON	Physique.

Secrétaire D. TOMBECK.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ROUX

MEMBRE DE L'INSTITUT ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

A MONSIEUR GABRIEL BERTRAND

PROFESSEUR A LA SORBONNE ET A L'INSTITUT PASTEUR

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR JEAN PERRIN

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

A MONSIEUR A. FERNBACH

MAITRE DE CONFÉRENCES A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS
PROFESSEUR A L'INSTITUT PASTEUR

Hommage de respectueuse reconnaissance.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS

1. Origine du travail	3
---------------------------------	---

Chapitre Premier. — Introduction.

2. Historique de la bougie filtrante	5
3. Propriétés colloïdales des solutions diastasiques	6
4. Filtration des colloïdes	7
5. Influence de la pression	8
6. Adsorption	10
7. Rôle des tampons	10

Chapitre II. — Technique générale.

8. Plan d'expériences	12
9. Bougies employées.	13
10. Dosage des diastases	14
11. Changements de réaction par filtration	14
12. Mode opératoire	15

Chapitre III. — Diastases de l'*Aspergillus niger*.

13. Sucrase	18
14. Application. Extraction de la sucrase	20
15. Découverte de la cellulase, sa distinction d'avec l'émulsion et la maltase	22

Chapitre IV. — Diastases du malt.

16. Amylase (Diastase liquéfiante)	27
17. Dextrinase (Diastase saccharifiante)	28
18. Peroxydiastase	29

Chapitre V. — Diastases d'origines diverses.

A. *Emulsine.*

19.	Méthode de dosage	31
20.	Emulsine en poudre du commerce	32
21.	Action des alcalis	35
22.	Emulsine du lait d'amandes douces.	36

B. *Diastases protéolytiques.*

23.	Dosage des acides aminés d'après Sørensen	38
24.	Pepsine	39
25.	Action des sels.	40
26.	Trypsine	41
27.	Papaïne	42
28.	Action du blanc d'œuf	43
29.	Présure. Expériences de Casimir Funk et Niemann.	45

C. *Catalase.*

30.	Sa filtration	45
-----	-------------------------	----

Chapitre VI. — Théorie de la Filtration.

31.	Etat plus ou moins glissant des parois filtrantes	47
32.	Action des sels	47
33.	Effet de l'adsorption	48
34.	Grosseur des micelles colloïdales	48

Chapitre VII. — Application de ces théories à diverses diastases.

35.	Sucrase par autodigestion de l' <i>Aspergillus</i>	49
36.	Id. Action des sels.	51
37.	Id. Action de l'albumine	52
38.	Id. Réaction intermédiaire	53
39.	Id. Action de la peptone	54
40.	Id. Bougies albumineuses	55
41.	Id. Action d'une très forte acidité	56
42.	Généralisation de l'action de l'albumine à l'emulsine	57
43.	Conséquence : La Sucrase est adsorbée	58
44.	Filtrations successives. Cas de la zymase.	59
45.	Pepsine.	60

CONCLUSIONS

FIN

AVANT-PROPOS

1. Origine du travail. — Dans un travail fait au laboratoire de M. Gab. BERTRAND sur les diastases de l'orge et du malt (1), je tenais à avoir des solutions stériles. J'avais à choisir entre la méthode aseptique de filtration sur bougie Chamberland et la méthode des antiseptiques imaginée par MUNTZ (2). Cette dernière, beaucoup plus simple que la première, offre un grand danger : comme l'on sait, les microbes se développent souvent dans les liquides malgré la présence des antiseptiques. On est donc exposé à trouver des diastases qui ont été produites par les microbes et n'existaient pas dans le liquide.

La méthode par filtration est évidemment beaucoup plus élégante, réalisant l'asepsie rigoureuse. Cependant, elle aussi, n'est pas à l'abri de tout reproche. Tandis que l'emploi d'antiseptiques peut faire croire à la présence de diastases qui n'existaient pas dans le liquide, la méthode de filtration telle qu'on l'employait autrefois a le défaut inverse : c'est un fait connu que la filtration rend souvent inactives des solutions et fait croire à tort à l'absence de certaines diastases.

J'ai cependant préféré la méthode de filtration comme beaucoup plus rigoureuse. J'ai cherché à la perfectionner en étudiant les divers facteurs qui peuvent influencer la filtrabilité des diastases. C'est alors que j'ai trouvé l'importance capitale de la réaction du milieu dans la filtration. Ce sont ces travaux que je développerai ici; une courte introduction rappellera d'abord les notions utiles à la compréhension du phénomène.

(1) MAURICE HOLDERER Les diastases de l'orge et du malt, 7^e Congrès internat. de Chimie appliquée. Section VI, b. (fermentation) le 31 mai 1909.

(2) MÜNTZ, *C. R.* **80**, 4250 (1875).

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

2. Historique de la bougie filtrante. — En général, on stérilise les solutions en les filtrant sur bougies de porcelaine. La forme moderne des filtres usités dans les laboratoires remonte à NADAULT DE BUFFON (1), qui employait déjà des appareils tubulaires formés d'une masse filtrante fortement comprimée. L'eau traversait les parois de ces tubes en allant du dehors au dedans. La forme a été conservée, mais non la matière filtrante. Ainsi ZAHN (2) (1869) prend des vases en poterie non émaillée, PASTEUR ET JOUBERT (3) utilisent le plâtre, qui a l'inconvénient d'être soluble dans l'eau. MIQUEL (4) conseille la porcelaine et d'autres substances insolubles. Indépendamment de lui, A. GAUTIER (5) se sert de bouteilles de porcelaine jusqu'à ce que CHAMBERLAND (6), le 4 août 1884, vienne présenter ses bougies en biscuit. Depuis elles ont été modifiées par GARROS et MERAN (7), BERKEFELD (8), MARTIN (9), MIQUEL, GRENET (10) et SALIMBENI (11).

(1) NADAULT DE BUFFON, *C. R. Ac. des Sc.*, **44**, 474 (1857).

(2) ZAHN, *Pflügers Archiv.*, **2**, 598 (1869).

(3) PASTEUR & JOUBERT, *C. R.* **84**, 900 et **85**, 101 (1877).

(4) MIQUEL, *Annuaire de l'Observatoire de Monsouris*, 1882, p. 431 et *Traité des Organismes vivants de l'Atmosphère*, 1883, p. 462 et suivantes.

(5) ARMAND GAUTIER, *C. R.* **94**, 652 (1882) et **151**, 1016 (1910).

(6) CHAMBERLAND, *C. R.* **99**, 247 (1884).

(7) GARROS et MERAN. Brevet français 214 467, 27 juin 1891 et Armand Gautier *C. R.* **117**, 964 (1893).

(8) Voir H. NORDMEYER, *Zeitschr. f. Hygiene.* **10**, 145 (1891).

(9) MARTIN, *Journ. of Physiolog.* **20**, 364 (1896).

(10) F. GRENET, *C. R.*, **151**, 941 (1910).

(11) GRENET et SALIMBENI, *C. R.*, **152**, 916 (1911).

Dans toutes mes expériences, j'ai employé les filtres Chamberland F.

3. Propriétés colloïdales des solutions diastasiques. — Les solutions diastasiques sont toutes de nature colloïdale. Elles ont donc diverses propriétés qui influent sur leur filtrabilité, ainsi que sur la vitesse de filtration du liquide.

Comme l'on sait, les colloïdes ne sont pas véritablement dissous, mais constitués par des granules ou micelles insolubles. Ceux-ci portent une charge électrique positive ou négative; d'après leur signe, on distinguera des colloïdes positifs et négatifs.

Le volume des granules est très variable. Il est surtout fonction de la réaction du milieu. Nous devons donc, dans la filtration, tenir compte de cette réaction, d'autant plus que, de cette dernière, dépendent le signe et la grandeur de la charge électrique. PERRIN (1) nous apprend, en effet, que toute paroi en contact avec une solution alcaline est chargée d'électricité négative. Si la solution est acide, la paroi est positive. En regard de la charge de la paroi, se trouve sur le liquide une charge de signe contraire qui neutralise la première. Si la paroi est très petite, par exemple constituée par une poudre ou des micelles insolubles, les règles sont les mêmes.

Une paroi négative et les micelles négatives d'un colloïde de même signe sont déchargées par les acides et par les ions positifs polyvalents. Cette décharge est suivie de la coagulation du colloïde. Au contraire, les alcalis augmentent la charge négative et stabilisent les colloïdes négatifs.

Réciproquement, les parois positives et les colloïdes positifs (très peu répandus dans la nature) sont déchargés par les alcalis et les ions polyvalents négatifs.

Remarquons que toute coagulation correspond à une augmentation de volume des micelles par réunion d'un certain nombre d'éléments, tandis que la stabilisation va de front avec une diminution graduelle des dimensions des granules.

Ces règles, que PERRIN a établies, furent vérifiées par l'obser-

(1) PERRIN, *Journal de Chimie-physique*, **2**, 601 (1904) **3**, 50 (1905).

vation ultramicroscopique, par MAYER, SCHAEFFER et TERROINE (1).

Si comme QUINKE (2), nous obligeons de l'eau alcaline à circuler à travers un tube capillaire, ou un bouchon de sable ou de gélatine par exemple, nous entraînons la charge positive de l'eau vers la sortie, tandis que du côté de l'entrée, on aura accumulation d'électricité négative. Les deux charges positive et négative à la sortie et à l'entrée constituent une force électromotrice de filtration s'opposant au mouvement du liquide. Des sels à ions polyvalents positifs diminueront beaucoup l'électrisation de contact et, par suite la différence de potentiel.

PIERRE GIRARD (3) démontre que la vitesse de diffusion des sels à travers une membrane ou un bouchon de gélatine, est fortement influencée par cette force électromotrice de filtration. Une trace de HCl, ajoutée à une solution de $MgCl^2$ fait tomber la vitesse de passage de 12 à 3,5 mgr, tandis qu'une trace de NaOH peut doubler la vitesse de passage du NaCl à travers la gélatine. GIRARD tire de ces phénomènes une explication de l'électivité de sécrétion de certaines membranes. Ce fait pourrait bien intervenir dans l'activité des diastases filtrées.

Un autre facteur intervenant dans la vitesse de filtration est la répartition des granules. Quand l'équilibre est atteint, la concentration aux différentes altitudes n'est nullement uniforme, mais suit une loi exponentielle, tout comme la concentration des différentes couches d'un gaz en équilibre sous l'effet de la pesanteur. Il y a cependant une différence : la rapidité avec laquelle la concentration diminue d'un niveau à un autre. Pour arriver à une densité moitié dans l'air, il faudra s'élever de 6 kilomètres, tandis que pour certains colloïdes, d'après PERRIN, 1/10 de millimètre suffisent à cet effet (4). Mais l'équilibre est toujours très lent à se produire.

4. Filtration des colloïdes. — En conséquence, pour filtrer une

(1) MAYER, SCHAEFFER et TERROINE, *C. R.* **145**, 918 (1907).

(2) QUINKE, *Ann der Physik u. Chemie*, **107** (1859) **110**, 38 (1860) **113**, 513 (1861).

(3) PIERRE GIRARD, *C. R.* **146**, 927 (1908) **148**, 1047, 1186 (1909) **150**, 1446, 151. 99 (1910).

(4) JEAN PERRIN, *C. R.* **146**, 967, **147**, 475 (1908) et *Ann. de chim. et physique*

(8) **18**, 1-114 (1909).

solution colloïdale, il faudra en principe orienter l'appareil de telle manière que la filtration ait lieu de bas en haut, vers les régions supérieures du liquide, et jamais de haut en bas, vers le niveau inférieur, de façon à éviter le colmatage.

On arrivera au même résultat en plaçant un appareil à agitation près du filtre, comme le fait BECHHOLD (1) qui double ainsi parfois le débit pour les colloïdes voisins de leur point de coagulation et possédant alors une faible solubilité et une faible pression osmotique (DUCLAUX) (2). Au contraire, une agitation, même énergique, n'aura aucun effet pour un colloïde stable à solubilité et pression osmotique élevées. Les granules concentrés au niveau de la surface filtrante auront le temps de diffuser.

5. Influence de la pression. — Ceci nous amène naturellement à parler de l'influence de la pression sur la filtration des colloïdes. En effet, si la différence de pression entre les deux côtés de la paroi filtrante augmente progressivement, il en sera de même de la vitesse de filtration. Le mouvement général de translation du liquide entraînera les micelles de plus en plus rapidement contre le filtre. A un moment donné, la vitesse de circulation du liquide deviendra supérieure à la vitesse de diffusion des micelles qui seront accumulées contre la paroi filtrante. Il en résultera un colmatage. A un arrêt, les micelles diffuseront et dégageront la surface; la vitesse de filtration reprendra sa valeur primitive (RUNEBERG, 1877) (3).

Une augmentation de la pression pendant un temps, même assez court, colmatara de nouveau la surface filtrante et cette obstruction persistera un certain temps, même si on a sensiblement diminué la pression de filtration. Le débit d'un filtre ne dépend donc pas seulement de la pression au moment considéré, mais aussi de celle qui régnait auparavant (4).

(1) BECHHOLD, *Z. f. physik. Chemie*, **60**, 257-318 (1907).

(2) J. DUCLAUX, *C. R.* **148**, 295 et 714 (1909) et *Z. f. Chemie u. Indust. der Kolloide*, **7**, 74-81 (1910).

(3) RUNEBERG, *Arch. der ges. Heilkunde*, **18**, 1 (1877).

(4) La filtrabilité varie dans le même sens que la vitesse. Si on supprime la pression et qu'on la rétablit ensuite, le filtrat sera souvent, pour commencer beaucoup plus concentré que le colloïde primitif. Il en est de même pour les sels. Après un arrêt dans la pression, on peut avoir, pour les filtrations faites sur mem-

Pour toute solution colloïdale, si on veut avoir un débit maximum, on doit régler la pression de filtration d'après la stabilité du colloïde. Elle sera d'autant plus faible que le colloïde sera plus voisin du point de coagulation, surtout si la filtration a lieu sans renouvellement des couches liquides contre les parois, renouvellement qui balaye les micelles entassées contre le filtre.

Je dis entassées et non coagulées. En effet, au point de vue de la « vitesse de filtration », il y a une grande différence si les micelles se sont réunies déjà avant leur arrivée à la surface filtrante, ou si elles ne se réunissent que juste au contact de cette dernière. On a émis bien des hypothèses à ce sujet. Par exemple, on fait intervenir une affinité du liquide pour les micelles, celles-ci étant mouillées ou non. L'épaisseur de la couche immobilisée contre les micelles serait variable, comme les mémorables travaux de E. DUCLAUX (1) semblent le laisser entrevoir.

Je comparerai les gros granules d'un colloïde à des blocs de pierres. Si nous les entassons sur un tamis, il restera d'énormes interstices et de l'eau passera rapidement au travers. Plus nous broierons les blocs, plus les interstices seront faibles et plus la filtration sera lente. Si nous avons pulvérisé les pierres, le débit sera insignifiant. Pourtant, le volume total des interstices n'a guère diminué (il serait rigoureusement le même, si nous envisagions des sphères). Nous avons, en somme, une application de la loi de POISEUILLE (2). Le débit des tubes capillaires est proportionnel à la quatrième puissance de leur diamètre. Prenons 100 tubes de diamètre dix fois plus petits : leur section totale sera la même, mais leur débit total 100 fois moindre que celui du tube unique.

Mais nous avons vu que la grosseur des micelles est surtout fonction de la réaction du milieu. Rien d'étonnant donc qu'au point de vue « vitesse de filtration », ce soit encore la réaction du milieu qui soit le facteur le plus important. Un liquide organique

branes animales bougies gélatinées etc. des filtrats plus riches en sels que la solution initiale. (Runeberg, 1877, *Craw. Proc. Roy. Soc.* 77, B. 331 (1906). Au bout d'un certain temps la concentration saline peut être réduite. Il est probable que la force électro-motrice doit intervenir dans ces phénomènes, comme dans les expériences de Pierre Girard.

(1) E. DUCLAUX, *Ann. de Chim. et de Phys.* (4) 25, 433 (1872), ainsi que *Ann. de l'Inst. Agronomique* 1877 et suiv.

(2) POISEUILLE, *Mémoires Acad. des Sciences, Paris*, 11, 433 (1846).

à très petites micelles filtrera rapidement si les micelles traversent le filtre. Mais comme les micelles n'ont pas toutes les mêmes dimensions, les passages du filtre seront bouchés, surtout si nous avons eu l'imprudence d'élever par trop la pression : tout sera arrêté. Les macérations alcalines filtreront toutes très lentement et les macérations acides bien plus vite.

6. Adsorption. — Nous venons de voir le rôle de la grosseur des micelles colloïdales. Il ne faudrait cependant pas être trop absolu et toujours comparer la filtration à un criblage de grains de blé, ne laissant passer que les poussières. Comme DUCLAUX le fit remarquer pour les microbes, de même les colloïdes et les diastases sont presque toujours arrêtées par une affinité particulière de la porcelaine poreuse. Nous nous trouvons alors en présence d'un véritable phénomène de teinture dépendant de la réaction du milieu et des ions polyvalents coagulateurs (Voir par exemple PELET-JOLIVET (1).) Certaines expériences non pas de filtration, mais d'adsorption ont déjà été faites par MICHAELIS (2) qui agitait différentes poudres avec des albuminoïdes et des diastases. Encore la réaction intervient dans ces expériences.

Au point de vue de la filtration des diastases, un problème se pose donc : Une diastase retenue par un filtre l'est-elle par « criblage » ou par « teinture » sur la bougie ? Cette question sera traitée à la fin du travail.

7. Rôle des Tampons. — Au double point de vue de grosseur des micelles et de l'adsorption dans la filtration des diastases, nous devons donc ne pas négliger la réaction du milieu. Pourquoi ne s'en est-on pas préoccupé plus tôt ? C'est d'autant plus étonnant que le terrain avait été admirablement préparé par un important travail de HUGOUNENQ (3). Cet auteur filtrait sur bougie de la caséine plus ou moins dissoute dans des doses variables de carbonate de sodium. Plus il ajoutait d'alcali, mieux la caséine traversait la bougie.

(1) PELET-JOLIVET, *Théorie des Färbeprozesses*, (Dresde 1910).

(2) MICHAELIS, RONA et EHRENREICH, *Biochem. Zeitsch.* **2**, 219, **5**, (365) **7**, 488. 492, (1907) **10**, 283 (1908).

(3) HUGOUNENQ, *Ann. de Chimie et Physique* (6) **28**, 528-537 (1893).

Seulement, à cette époque, on était encore trop sous l'influence des travaux anciens sur les diastases. Tous les auteurs étaient d'accord pour annoncer que des traces d'alcalis détruisent rapidement les diastases. Se seraient-ils trompés? Certainement non, mais on a fait une généralisation exagérée. On voulait alors chercher des diastases pures, débarrassées des sels par précipitations successives et dialyse. La moindre trace d'alcali ou d'acide modifiait alors formidablement la réaction du milieu. En effet, on pouvait presque comparer ces solutions diastasiques à de l'eau distillée. Or, une goutte de soude décime dans 100 cc. d'eau distillée pure fait virer au rouge la phénolphthaléine, tandis qu'une goutte d'acide chlorhydrique de même force fait virer l'eau au méthylorange, donnant une coloration rose. Supposons au contraire une solution riche en sels, par exemple une solution contenant par litre un dixième de molécule gramme de phosphate bisodique et autant de phosphate monosodique. Pour faire virer 100 cc. de cette solution soit au méthylorange, soit à la phthaléine, il nous faudra employer soit 100 cc. d'acide décime, soit 100 cc. de soude. Une goutte est donc sans importance. Ce mélange salin forme un amortisseur des variations de réactions. FERNBACH et HUBERT (1) qui, les premiers, ont introduit cette notion, appellent un tel mélange un « tampon ». Comme on ne voyait autrefois que la dose de soude ajoutée et pas la concentration en ions H et OH, on avait généralisé par extension de ce qui se passe pour les diastases dialysées, disant que la moindre trace d'alcali détruit instantanément les diastases. Il fallait évaluer la réaction, c'est-à-dire mesurer la concentration en ions H et OH, soit par la mesure des forces électromotrices de piles de concentration en ions H, soit, ce qui est beaucoup plus simple, en employant des indicateurs qui virent à des réactions très différentes. C'est ce que j'ai fait en employant la phénolphthaléine, et le méthylorange.

(1) FERNBACH et HUBERT, *C. R.*, **131**, 293 (1900).

CHAPITRE II

TECHNIQUE GÉNÉRALE

8. Plan d'expériences. — Voici maintenant les résultats de mes expériences. Leur exposé comprendra deux parties. Dans la première, je montrerai qu'à la neutralité au méthylorange, la filtration à la bougie Chamberland F retient toutes les diastases, pourvu qu'elles soient dans un état de pureté suffisant, tandis qu'elles traversent aisément la bougie si la réaction est plus alcaline. Les diastases examinées sont :

Sucrase	de l' <i>Aspergillus niger</i> .
Cellase	} — (en collaboration avec M. Gab. BERTRAND).
Emulsine	
Maltase	
Peroxydiastase	} de la macération aqueuse du malt.
Dextrinase	
Amylase	
Emulsine	en poudre et celle du lait d'amandes douces.
Pepsine	} produits commerciaux obtenus par précipitation avec l'alcool.
Trypsine	
Papaïne	du suc desséché de <i>Carica papaya</i> .
Présure	D'après les recherches de CAS. FUNK et A. NIEMANN.
Catalase	de la panne de porc.

La seconde partie comprendra l'explication du mécanisme de l'arrêt des diastases par filtration. De même j'y indiquerai le moyen pratique pour faire passer presque toutes les diastases à travers

les bougies, en toute réaction même acide et je montrerai que l'auto-digestion est sans effet pour ces diastases au point de vue de la filtrabilité.

9. Bougies employées. — Je me suis servi des bougies Chamberland F cylindriques sans téton. Les bougies neuves sont lavées en aspirant environ 300 cc. d'eau distillée à travers la bougie. Celles ayant servi, après lavage, sont rincées par aspiration d'eau distillée, puis séchées à l'étuve à 100°. Le lendemain on les chauffe au rouge sombre dans le four à moufle pour calciner la matière organique fixée par la bougie. Après refroidissement, elles sont naturellement parfaitement sèches et présentent une affinité très grande pour l'eau. On met à l'intérieur de la bougie un agitateur assez gros de façon à en combler presque tout le creux et on ferme avec un bouchon de caoutchouc. Le système est alors plongé dans un tube en verre contenant de l'eau qui, avidement absorbée par la bougie, chasse l'air des pores. Ce gaz est ainsi refoulé vers l'intérieur. Comme l'espace libre dans le creux de la bougie est très petit, l'air venant des pores augmente beaucoup la pression intérieure. S'il y a un défaut dans la bougie, on le verra très rapidement par le fait qu'il s'en échappera de petites bulles d'air. Rarement, ces défauts se trouvent dans la partie rugueuse de la bougie. Presque toujours, au contraire, la partie émaillée est défectueuse, mais comme la bougie ne plonge pas aussi profondément dans le liquide, ces défauts n'ont pas d'importance. On lave de nouveau la bougie par aspiration d'eau distillée. Les filtrations étaient faites non pas dans les conditions optimales décrites dans l'introduction, mais comme on opère en général dans les laboratoires, en plaçant les bougies verticalement. Pour user moins de liquide diastasique, j'ai choisi quelques tubes à essais d'un diamètre un peu plus gros que la bougie. A une distance de 10 cm. du fond, j'ai soufflé une boule d'une capacité de 50 à 100 cc., coupé la partie supérieure de la boule, et évasé l'ouverture. Si, pour procéder à la filtration dans ce tube, on enfonce la bougie, elle sera mouillée sur une grande hauteur même avec peu de liquide. On réunit la bougie à une pipette à boule et le vide est fait par une trompe à eau.

10. Dosage des diastases. — Comment allons-nous voir si une diastase est arrêtée par le filtre ou si elle passe au travers? Le moyen évident est de comparer l'activité du filtrat à celle du liquide initial. Leur rapport multiplié par 100 représente la filtrabilité de la diastase. Nous aurons donc à doser les différents échantillons diastasiques. Dans ce but, nous les ferons agir tous séparément sur la substance à transformer en nous plaçant naturellement dans les mêmes conditions de température, concentrations et autres.

Il est important de n'employer que de faibles quantités de diastases de façon à se trouver dans les conditions signalées par KJELDAHL (1) où les effets diastasiques sont proportionnels aux quantités de diastases employées.

D'autre part, l'influence des acides est capitale comme l'ont fait voir LEYSER (2), KJELDAHL (3), O'SULLIVAN (4), FERNBACH (5), FORD (6), MAQUENNE et ROUX (7), Gab. BERTRAND (8), SOERENSEN (9). Ce dernier démontre qu'à part certains sels toxiques, comme ceux de mercure et de cuivre, l'activité diastasique dépend surtout de la concentration en ions hydrogène. Il en assure la constance par une série de « tampons ».

J'ai eu recours en général à ces tampons, en particulier celui constitué par un mélange d'acide acétique et d'acétate de sodium. Cet artifice est d'autant plus nécessaire qu'il permet d'éviter une cause d'erreur inhérente à ma méthode de filtration, que je vais décrire maintenant.

11. Changements de réaction par filtration. — Filtrons sur une bougie de porcelaine de l'eau acidifiée légèrement au méthylorange par HCl et contenant une goutte de méthylorange. La

(1) KJELDAHL, *C. R. Lab. de Carlsberg*, **1**, (1877). Voir le résumé en français à la fin du volume.

(2) LEYSER, *Der bayriche Bierbrauer* (1869) p. 30.

(3) KJELDAHL, *loc. cit.*

(4) O' SULLIVAN et TOMPSON, *J. of Chem. Soc.*, **57**, 854 (1890).

(5) A. FERNBACH, *Thèse Sciences physiques*, Paris (1890).

(6) FORD, *J. of the Chemical Industrie*, **23**, (30 avril 1904).

(7) MAQUENNE et ROUX, *C. R.* **142**, 124 (1906).

(8) GAB. BERTRAND, *Ann. Inst. Pasteur*, **21**, 673 (1907).

(9) SÖRENSEN, *C. R. Lab. de Carlsberg*, **8**, 1-168 (1910).

solution rose avant filtration sera presque décolorée après. Ce n'est pas l'indicateur qui a été arrêté par la filtration, mais l'acidité a été saturée. En effet, une nouvelle goutte de méthylorange colorera le filtrat en jaune et non en rouge.

Réciproquement, alcalinisons légèrement de l'eau à la phénolphthaléine avec de la soude et filtrons. La solution rose avant filtration est décolorée après et reste incolore avec une nouvelle goutte de phénolphthaléine. Il y a donc eu une petite quantité de soude fixée par la bougie.

Les solutions diastasiques étaient, à part la pepsine, toutes à une réaction intermédiaire entre la neutralité à la phénolphthaléine et l'orangé. Pour examiner la filtrabilité à la réaction neutre à l'orangé, il faudra acidifier par une certaine quantité de HCl. Lors de la filtration, la bougie absorbera nécessairement une trace de cet acide. A la neutralisation par une proportion équivalente de soude, je ne peux pas tenir compte de l'acide fixé par la bougie, ne pouvant pas l'évaluer. Mon liquide contient donc trop d'alcali. De même la solution filtrée alcaline, sera trop acide après saturation. Ceci explique les résultats invraisemblables que j'ai eus au début avec la sucrase d'*Aspergillus niger* qui, filtrée à la neutralité à la phénolphthaléine, était plus active que la portion non filtrée. On aurait pu penser que la filtration retenait des matières toxiques gênant la diastase. Il n'en était rien, car dès que j'ai opéré en présence de tampons, cette « activation apparente par filtration » disparaissait.

12. Mode opératoire. — Pour les diastases étudiées, il suffisait d'un temps de contact assez court avec les substances sur lesquelles je faisais agir les enzymes. L'intervention des microbes n'était donc pas à craindre; aussi était-il inutile d'employer des antiseptiques ou d'opérer aseptiquement. Ce n'est que pour les expériences faites en collaboration avec M. GAB. BERTRAND sur la cellulase, l'émulsine et la maltase de la macération d' « *Aspergillus niger* » que nous opérâmes aseptiquement.

Je tenais à avoir toujours des résultats comparables. Il fallait donc amener les divers échantillons d'une même solution diastatique à des réactions différentes, puis les filtrer séparément sur des bougies préalablement calcinées, lavées et contrôlées comme

je l'ai décrit déjà. Ensuite sur une fraction de chaque échantillon filtré et non filtré, on rétablissait au même moment la réaction initiale aussi exactement que possible. Comme presque toujours, les dosages des diastases se faisaient en présence de tampons, une légère erreur dans la saturation n'avait pas d'importance.

Voici comment j'ai réalisé ces opérations :

On prépare un flacon de 250 cc. contenant de la soude décimale. Le bouchon de caoutchouc de ce flacon est traversé par une pipette dont l'extrémité extérieure est bouchée soigneusement. Comme la soude se carbonate peu à peu, elle est renouvelée fréquemment.

Un flacon semblable contient de l'acide chlorhydrique non pas normal, mais d'un titre tel que 60 gouttes de NaOH soient très exactement neutralisées par 60 gouttes de HCl, la vérification se faisant dans un court tube à essai, à l'ébullition, en présence du tournesol comme indicateur.

Les solutions plus riches en sels et pourvues de tampons naturels, par exemple l'extrait de malt, nécessiteraient un nombre de gouttes trop élevé. On fait donc deux solutions correspondantes mais environ douze fois plus fortes.

Il est indispensable de tenir les pipettes toujours dans la même position verticale, de laisser tomber les gouttes avec la même vitesse et surtout de ne jamais toucher des doigts l'extrémité des pipettes, pour éviter des modifications importantes de la tension superficielle du liquide. J'étais tenté de me servir de deux compte-gouttes de M. Yvon (1), mais la soude aurait rapidement détérioré l'appareil, aussi ai-je renoncé à son emploi. Pour d'autres liquides, cet appareil est parfait, l'écoulement se faisant toujours sous la même pression, car l'intérieur de la pipette constitue un vase de Mariotte.

Pour mieux faire comprendre, je citerai un exemple :

J'ai 220 cc. d'une solution diastasique d'« *Aspergillus niger* ». Pour faire virer 10 cc. au méthylorange, il faut entre 7 et 8 gouttes d'HCl dilué, tandis qu'il faut 5 gouttes de NaOH pour faire virer 10 cc. à la phénophtaléine. Je prends 3 fois 60 cc. de liquide. Le premier échantillon désigné par O sera amené au rose à l'orangé par $6 \times 8 = 48$ gouttes de HCl. Le second, N, ne reçoit aucune addition.

(1) Yvon, *Du compte-goutte normal*, Paris, 1905 (chez Octave Doin).

Le troisième, P, est neutralisé à la phénophtaléine par $6 \times 5 = 30$ gouttes de soude. On prélève 10 cc. plus 8 gouttes de O, 10 cc. de N, et 10 cc. plus 5 gouttes de P qu'on met dans 3 verres à pied. Le reste des solutions est filtré sur trois bougies différentes. A chaque filtration, on rejette les 30 premiers cc. qui servent à rincer la pipette, et on prélève sur la fin du filtrat les mêmes fractions que pour les liquides non filtrés. On procède alors à la neutralisation des six fractions en même temps, en ajoutant à O huit gouttes de soude, à P huit gouttes de HCl, plus trois gouttes de soude; quant à N on ajoute huit gouttes de soude et autant d'acide. Une septième fraction, prélevée par exemple sur les 30 premiers cc. du filtrat de N, est amenée à la même concentration en sels et bouillie. De chacune des sept fractions, on prélève un même volume, par exemple 2 cc., qui servira au dosage de la diastase.

Après cet exposé je puis maintenant passer en revue les différentes diastases que j'ai filtrées.

CHAPITRE III

DIASTASES DE L'ASPERGILLUS NIGER

Pour préparer ces diastases j'emploie la méthode indiquée en 1883, par DUCLAUX (1). Le mycelium de la plante, cultivée sur liquide Raulin, est, après sporulation, lavé rapidement et mis à macérer sur de l'eau distillée. J'ai d'abord étudié la sucrase, puis, en collaboration avec M. Gab. BERTRAND, la cellase, l'émulsine et la maltase de la même moisissure.

13. Sucrase. — Dans les tableaux suivants, je donne les résultats de l'activité de divers échantillons de sucrase ayant subi des traitements différents, mais provenant tous d'un même mycélium bien sporulé cultivé 3 jours à 35° et mis à macérer pendant 20 heures à l'étuve à 38°. Il est important de définir la durée de macération, car comme je le montrerai plus loin, en prolongeant la macération on a une solution diastasique qui, si le mycélium a été bien lavé, est très près de la neutralité à la phénol-phtaléine; parfois même elle est alcaline à ce réactif comme je l'ai constaté après 5 jours de macération.

La méthode de dosage de la sucrase est à peu près celle de A. FERNBACH (2). J'opère sur 2 cc. de chaque diastase avec 3 cc. d'eau et 5 cc. d'une solution sucrée. Celle-ci contient 20 pour 100 de saccharose, 2 pour 100 d'acide acétique et des traces d'acétate de sodium. Au commencement, je n'employais que 0,010 p. 100, mais dans la suite, j'ai mis environ 0,3 p. 100 de ce sel. L'acétate de sodium sert de tampon et aussi à saturer par double dé-

(1) E. DUCLAUX *Chimie biologique* Paris 1883.

(2) A. FERNBACH, La sucrase. *Thèse sciences physiq.* Paris 1890, page 36.

composition les traces de HCl qui pourraient être en excès après la saturation de la soude. Des traces de HCl sont alors remplacées par de l'acide acétique qui, lui, est sans effet en présence de l'énorme dose de 1 p. 100 de cet acide. Mais, même si je n'avais pas ajouté cet acétate de sodium, la saturation était assez précise et les traces infinitésimales de HCl en excès auraient trouvé certainement dans la diastase des éléments suffisants à sa saturation.

Les mélanges ci-dessus étaient placés dans des tubes à essais, une heure au bain-marie réglé à 55-56°. On arrête l'action de la diastase en refroidissant les tubes et en ajoutant de la soude jusqu'à légère alcalinité à la phénolphthaléine. Pour procéder aux dosages, le contenu de chaque tube est amené à 50 cc. et le sucre interverti est dosé sur 20 cc. chiffre qui représente les 2 cinquièmes du sucre réducteur contenu dans le tube. La méthode de dosage employée est celle de GAB. BERTRAND (1). Pour les expériences nécessitant moins de précision, j'ai employé la méthode à la goutte. Elle consiste à faire bouillir un volume connu de liqueur de Fehling (2 cc.) et d'y ajouter, avec une pipette très fine, un nombre de gouttes juste suffisant pour produire la réduction totale du cuivre, c'est-à-dire jusqu'à ce que la solution ne soit plus bleue, mais incolore ou très légèrement jaune.

Je donne dans le tableau suivant l'ensemble des résultats:

SUCRASE D'ASPERGILLUS NIGER. — MACÉRATION DE 20 HEURES 38°

N°	Nature de la sucrase	Sucre interverti en 1 heure à 56°			filtrabilité (2)
		total mgr.	par la diastase seule mgr.	%	
1	N	79.5	54.5	12.9	25 %
2	N filtré	38.5	13.5	3.2	
3	N bouilli	25.0	0	0	
4	O	78	53	12.6	4 %
5	O filtré	27	2	0.4	
6	P	77	52	12.4	100 %
7	P filtré	77	52	12.4	

(1) GABRIEL BERTRAND, *Bull. Soc. Chimiq.* (3) **35**, 1285 (1906).

(2) Voir la définition au § 40.

Les chiffres du tableau ci-dessus sont démonstratifs. Cette diastase provenant d'une macération courte, il est important d'insister sur ce détail, traverse complètement le filtre Chamberland en milieu neutre à la phénolphtaléine; elle ne la traverse pas du tout à la neutralité à l'orangé; pour une réaction intermédiaire, la filtrabilité est partielle. C'est cette même règle que j'ai démontrée pour les autres diastases.

14. Application. — Extraction de la sucrase. — L'extraction d'une diastase nécessite sa filtration à travers les parois des cellules. En alcalinisant l'eau de macération, nous devons donc faciliter l'extraction. L'expérience suivante démontre qu'il en est bien ainsi :

Trois cuvettes (6 centimètres × 12 centimètres) identiques d'« *Aspergillus niger* » sont mises à macérer chacune avec 140 cc. d'eau distillée. A l'une, A, j'ajoute 20 cc. de HCl cinquième normal; à l'autre, B, 10 cc. d'une solution de phosphate trisodique à 10 p. 100. A la troisième, N, je n'ajoute rien. Après un séjour de 5 heures à l'étuve à 31°, je sature A par 10 cc. de phosphate, et B par 20 cc. de HCL. Quant à N, j'y ajoute simultanément l'acide et le phosphate. J'agite et après encore 15 minutes de contact avec le mycélium je dose l'activité de la sucrase.

Sucrased		Sucre interverti		
		total	par la sucrase seule	
A	Macération acide	31.5 mgr	10 mgr	2.4 %
N	» neutre	34.5	13	3.1
B	» basique	48.5	27	6.4
Nb	» neutre bouillie	21.5	0	0

Les dosages sont faits comme les autres, 2 cc. de diastase, 3 cc. d'eau, 5 cc. d'une solution à 20 % de saccharose, 2 % d'acide acétique et 0.05 % d'acétate de sodium, toujours en employant la méthode de Gab. BERTRAND pour le dosage du sucre réducteur formé.

De ce tableau il ressort clairement que nous avons plus que doublé l'activité en faisant la macération en milieu alcalin.

J'insiste ici sur l'emploi de phosphate de soude tribasique.

Ce sel constitue une réserve importante d'alcali sans cependant donner une réaction par trop alcaline. Ainsi la thionine (employée par Maurice Nicolle en microbiologie pour la coloration des microbes) est rose à la soude caustique, violette en réaction moins alcaline. Son virage correspond au phosphate trisodique. Ce sel est donc moins alcalin que la soude libre.

La macération acide aurait peut-être été un peu plus démonstrative si j'avais pris un acide moins fort, l'acide acétique, ou encore mieux du phosphate acide de sodium. On pourrait dans cette expérience m'objecter que la dose de HCl libre était 20 cc. de HCl n/5 dans 160 cc., ce qui fait de l'acide n/40. Mais ce n'est pas le titre réel dans la macération, une grande portion de l'acide étant certainement saturée par le mycélium; le titre pouvait ainsi n'être que n/100 par exemple. Or, j'ai vu qu'une dose de 5 p. 100 d'acide acétique ou 2,00 d'HCl ne détruisent pas trop rapidement la sucrase de l'*Aspergillus* qui reste toujours parfaitement limpide. Si réellement il y avait eu destruction de la sucrase, ce n'aurait été que pendant les premiers instants; l'emploi de l'acide chlorhydrique était donc assez justifié. En tous cas, il était plus indiqué que l'acide acétique ou le tampon acide acétique+acétate de sodium, car l'acide acétique aurait, surtout pour un mycélium jeune, pu servir de nourriture à la plante et celle-ci n'aurait plus été dans l'état d'inanition nécessaire comme l'on sait, à la sécrétion abondante de sucrase.

En publiant, fin 1909, ces résultats, j'ai dit que c'était probablement là un phénomène général (1), les macérations alcalines devant favoriser l'extraction des diastases. Tout récemment COLIN a confirmé ces faits pour une autre moisissure, le « *Botrytis cinerea* » (2). Il prépare avec du mycélium frais broyé les trois mélanges suivants :

I	{	Mycelium frais	15 gr	II	{	Mycelium frais	15 gr
		HCl n/10	40 cc			PO ⁴ Na ³ à 5 %	5 cc
		eau	30			eau	35 cc
III	{	Mycelium frais	15 gr				
		eau	40 cc				

(1) MAURICE HOLDERER, *C. R.* **149**, 1153 (1909).

(2) H. COLIN, Hydrolyse de qq. polysaccharides par le *Botrytis cinerea*. *Thèse sciences naturelles*, Paris, 1911, pages 38-40, 43-44 et 90-91.

Après un séjour de 24 heures à l'étuve à 26°, il filtre sur papier, sature de la manière convenable et amène au même volume. Il prend 8 cc. de macéré et 2 cc. d'une solution de saccharose renfermant 20 p. 100 de saccharose, 2 p. 100 d'acide acétique cristallisable et des traces d'acétate de sodium. Il place une heure à 36° puis dose, d'après la méthode de GAB. BERTRAND le sucre réducteur produit. Il trouve :

	Cu ² O	Sucre réducteur formé
Macération alcaline	44 mgr	22 mgr
» neutre	29	14.2
» acide	26	12.8

Il obtient donc exactement les mêmes résultats que ceux que j'ai observés pour la sucrase de l'« *Aspergillus niger* » qui viennent un peu tardivement confirmer une hypothèse émise par EM. BOURQUELOT, sur le mode de préparation du liquide fermentaire de l'« *Aspergillus niger* » (1). Cet auteur siphonne l'eau au dessous des cultures et la remplace par de l'eau distillée qu'il laisse macérer pendant 12 heures à la température ordinaire. Puis il jette ce premier liquide et le remplace par de l'eau distillée, et cette macération il la prolonge pendant 2-3 jours. Je cite textuellement ce que dit cet auteur : « La première eau n'acquiert jamais qu'une « activité très faible, même si on attend plusieurs jours. Il est « possible que la présence de petites portions d'acide provenant « du liquide nutritif qui imprègne la face inférieure de la culture « et se répand dans cette eau, mette obstacle à la sécrétion du « ferment. Dans tous les cas, plusieurs lavages successifs par introduction sous la moisissure, d'eau qu'on enlève aussitôt, donnent de moins bons résultats que le séjour prolongé dans la « cuvette d'une seule eau de lavage. »

Mais cette opinion n'a été soumise à aucune vérification expérimentale, elle n'avait donc aucune valeur avant ce travail.

15. Découverte de la Cellase. — Sa distinction d'avec l'émulsine et la maltase. — Une des premières applications de mes résul-

(1) EM. BOURQUELOT, La tréhalase. *Bull. de la soc. Mycologique de France*, 9, 189-194 (1893) en particulier, page 190 et 191.

tats, fut faite au sujet de la cellase. En collaboration avec M. GAB. BERTRAND (1), nous avons trouvé dans l'« *Aspergillus niger* » une diastase dédoublant le cellose, contrairement aux recherches de E. FISCHER et G. ZEMPLEN (2) qui n'ont pas pu l'y mettre en évidence. Le résultat négatif trouvé par ces auteurs tient évidemment au mode opératoire, différent du nôtre. Au lieu de se servir d'une solution aseptique d'« *Aspergillus* » préparée par plasmolyse du mycelium frais, ils ont suivi la méthode de BOURQUELOT dans laquelle on utilise l'extrait filtré du champignon sec (3). Or, la cellase est facilement retenue à l'intérieur des tubes mycéliens et par les parois du filtre de porcelaine, tout au moins lorsque le milieu dans lequel on veut la dissoudre est acide au méthylorange, condition qui est souvent réalisée, par exemple quand le mycélium n'a pas été suffisamment lavé. Pour que la cellase passe en dissolution même à travers le filtre de porcelaine, il faut que le liquide soit alcalin au méthylorange, mais neutre ou très légèrement acide à la phtaléine. Elle se comporte donc exactement comme la sucrase. Il nous est arrivé à nous-mêmes, dans nos premières expériences, de constater l'inactivité complète d'une macération d'« *Aspergillus* » filtrée, qui, cependant, dédoublait très bien le cellose avant son passage à la bougie. Trois tubes stériles renfermant chacun 0 gr. 050 de cellose et 8 cc. de macération avaient donné après 24 heures de contact à 37° :

	Cuivre réduit	Cellose dédoublée
Avec la diastase filtrée	68 mgr	0 %
» » non filtrée	98.5	94 %
» » bouillie	68	0

A la suite de mes expériences sur la sucrase, nous avons plus tard, dans une expérience effectuée avec une autre macération, neutralisé presque exactement à la phtaléine, par addition de soude, puis filtré à la bougie Chamberland F.; ensuite, nous avons ajouté aseptiquement au liquide la quantité juste nécessaire de HCl pour saturer la soude introduite. Deux tubes, renfermant chacun 0 gr. 050 de cellose ont alors été stérilisés par chauffage à l'auto-

(1) GAB. BERTRAND et M. HOLDERER, *C. R.* **149**, 1335 (1909) et *C. R.* **150**, 230 (1910) de même *Ann. Instit. Past.* **24**, 180-188 (1910).

(2) E. FISCHER et ZEMPLEN, *Ann. der. Chem.*, **365**, 1 (1909).

(3) BOURQUELOT, *C. R.* **116**, 826 (1893).

clave pendant 15 minutes à 120°. Le cellose n'est pas dédoublé par ce traitement comme nous l'avons vérifié. Il en est de même du maltose, et du saccharose. On a ajouté à l'un des tubes 2 cc. de la solution non bouillie. Après 16 heures de contact dans un bain-marie à 55-56° on a dosé le pouvoir réducteur et on a trouvé :

	Cuivre réduit	Cellose dédoublée
Avec la diastase bouillie	67.5	0 %
» » non bouillie	96	80 %

D'après cette expérience réalisée avec toute les précautions d'asepsie, l'hydrolyse du cellose est bien de nature diastasique, elle n'est pas due, comme on pourrait l'objecter, à l'action de quelques spores restées en suspension dans la macération d' « *Aspergillus niger*. »

Nous étions parvenus, M. BERTRAND et moi, à montrer que la cellase ne pouvait être confondue avec aucune des diastases déjà connues, excepté peut-être avec l'émulsine. Nous avons alors entrepris l'expérience suivante, basée sur la filtrabilité différente des diastases et sur l'influence qu'exercent les réactions du milieu sur cette filtrabilité, comme je l'ai déjà signalé.

De la macération d' « *Aspergillus niger* » fut divisée en trois portions, la première filtrée à la réaction neutre à la phtaléine P, la seconde à la neutralité au méthylorange, mais en s'arrêtant déjà tout au début du virage de l'indicateur. Enfin, pour la troisième, la filtration eut lieu à la réaction naturelle. Puis on rétablit la réaction initiale et la même concentration en sel dans les trois échantillons. Toutes les opérations avaient été faites aseptiquement.

Ceci étant préparé, on fit agir séparément les 3 solutions sur des quantités équimoléculaires de cellose, d'amygdaline et de maltose placées dans des tubes bouchés avec de l'ouate, et préalablement stérilisés à 115° pendant un quart d'heure. On s'était assuré par une série d'expériences préliminaires qu'une telle stérilisation ne transformait pas l'amygdaline (le pouvoir rotatoire reste absolument constant) et qu'elle n'hydrolyse pas, je l'ai déjà mentionné, ni le cellose, ni même le saccharose, à condition que ces substances soient sèches.

Les quantités mises en expérience ont été : avec le cellose et le maltose, 0 gr. 050 de sucre dans 4 cc. des liquides diastasiques; avec l'amygdaline, 0 gr. 373 dans 20 cc. de ces mêmes liquides.

Les tubes qui contenaient les mélanges sucrés ont été mis au thermostat, simplement bouchés avec leur tampon d'ouate, mais ceux qui renfermaient le glucoside ont été, au contraire, scellés à la lampe pour éviter les pertes ultérieures d'acide cyanhydrique. A l'analyse on a obtenu les résultats que voici :

1° Pour le cellose (après 40 heures à 37°)

				Cuivre réduit	Sucre dédoublé
Avec la macération filtrée	P			95	78.5 % env.
»	»	»	N	96	82
»	»	»	O	77	21

2° Pour l'amygdaline (après 40 heures à 37°)

				HCN	Glucoside dédoublé
Avec la macération filtrée	P			0.013	66 %.
»	»	»	N	0.0165	84
»	»	»	O	0.0076	38.5

3° Pour le maltose (après 1 heure à 56°)

				Cuivre réduit	Sucre dédoublé
Avec la macération filtrée	P			55.5	9 % env.
»	»	»	N	56.0	10
»	»	»	O	53.0	4
»	»	»	N bouillie	51.0	0

Il est facile de voir, en comparant ces résultats, que la cellase, l'émulsine et la maltase ont filtré d'une manière différente et, de plus, qu'elles ont été influencées inégalement par la réaction du milieu. Tandis, par exemple, que la neutralisation presque complète de la macération d'« *Aspergillus niger* » au méthylorange a réduit à peu près au quart le passage de la cellase à travers la bougie de porcelaine, elle a réduit seulement à la moitié environ, le passage de l'émulsine et de la maltase. L'action légèrement des-

tructrice de la soude s'est fait sentir, d'autre part, beaucoup plus sur l'émulsine que sur la cellase et surtout sur la maltase.

Ce sont là autant de différences qui tendent à faire considérer la cellase comme distincte aussi bien de l'émulsine qu'elle l'est certainement de la maltase (1).

(1) GAB. BERTRAND et ARTHUR COMPTON, *C. R.* **151**, 405 (1910) et *Ann. de l'Inst. Pasteur*, **24**, 931-734 (1910) ont confirmé depuis ce résultat.

CHAPITRE IV

DIASTASES DU MALT

Avec le malt, j'ai eu des résultats analogues (1). 60 gr. de malt finement moulus sont mis à macérer à la température ordinaire avec 600 cc. d'eau distillée, en agitant le mélange. Après une heure de contact, on filtre sur papier ordinaire. Le filtrat est divisé en trois portions. La première O est acidifiée avec HCl de façon à être franchement rose au méthylorange. La seconde P est neutralisée à laphénolphtaléine et la troisième N, reste à la réaction initiale.

16. Amylase. Diastase liquéfiante. — Comme l'extrait de malt est très riche en amylase, il faut prendre très peu d'extrait pour voir l'effet de la filtration. On dilue donc l'extrait au vingtième et on prend 1 cc. qu'on met dans des flacons coniques avec 50 cc. d'empois de fécule à 2 p. 100. Les flacons sont placés successivement une demi-heure au bain-marie réglé à 43°. Le pouvoir liquéfiant se mesure avec un viscosimètre, genre KLING (2), c'est-à-dire une pipette munie d'un tube de Mariotte intérieur pour réaliser un écoulement sous pression constante. Dans la colonne II du tableau suivant, j'indique le nombre de secondes nécessaires à l'écoulement de 25 cc. des empois liquéfiés par 1 cc. des extraits dilués. La colonne III donne les nombres obtenus en employant 1 cc. des extraits non dilués, c'est-à-dire 20 fois plus.

(1) MAURICE HOLDERER, *C. R. Acad. des Sciences*, **150**, 285 (1910).

(2) A. KLING, *Ann. de Chimie et Physiq.* (8) **5** 471 (1905) figure p. 504. C'est une modification de l'appareil de VARENNE et GODEFROY, *C. R.* **138** 79 (1904).

Nature de l'extrait diastasique	AMYLASE		DEXTRINASE		
	Durée d'écoulement de 25 cc d'empois avec 1 cc d'extrait		Cu ² O (1)	Maltose	Dédoublément pour 100 d'amidon
	dilué	non dilué			
N	106 ^s	77 ^s	59	53.8	21.2
N filtré	5750	78	36	32.5	12.8
N bouilli	6300	3300	0	0	0
O	5880	107	9	8	0.03
O filtré	6500	106	traces	traces	traces
P	192	77	45	40.8	16.1
P filtré	203	78	44.7	40.5	16.0

Pour l'écoulement de 25 cc. d'eau distillée, il faut 77 secondes.

On voit que l'acidification a fortement affaibli l'amylase, sans toutefois la détruire, car dans la colonne III, il y a liquéfaction presque complète. L'extrait O filtré donne un nombre plus grand que N bouilli, 6.500 au lieu de 6.300. Pourtant ce même extrait O filtré présente encore une certaine activité, ce qui ressort des chiffres de la colonne III, où il y a également bonne liquéfaction : c'est que les erreurs d'expériences ne sont pas négligeables. Il suffit d'une très faible variation de température pour avoir des écarts pouvant atteindre 2 p. 100 dans les résultats. On sait en effet que les variations du coefficient de viscosité dues à la température sont très grandes : environ un trentième par degré, la viscosité diminuant par une élévation de la température. De plus, dans les expériences sur les diastases du malt, ainsi que pour celles de la catalase, je n'ai pas employé de tampons, ainsi qu'il a été expliqué (page 10), l'échantillon O filtré sera légèrement plus alcalin que O. Malgré tout, les chiffres obtenus dans la colonne II montrent très nettement que la filtration alcaline P n'a pas retenu la diastase, comme cela a eu lieu dans la filtration neutre N et surtout acide O.

17. Dextrinase. — Diastase saccharifiante. — Je me suis inspiré de la méthode de FORD et GUTHRIE (2) pour comparer l'activité saccharifiante des échantillons diastases.

5 cc. des mêmes extraits de malt dilués au vingtième sont mis

(1) Déduction faite du pouvoir réducteur au à l'extrait, c'est-à-dire 3 mgr de Cu²O.

(2) FORD et GUTHRIE, *Jour. Inst. of Brewing*, 1905, p. 206.

en contact avec 50 cc. d'une solution à 3 p. 100 d'amidon soluble préparé d'après la méthode de MM. J. WOLFF et A. FERNBACH (1). On opère dans sept fioles jaugées de 100 cc., placées au bain-marie réglé à 51°. Après une heure, on retire les flacons. L'action diastasique est arrêtée par 4 gouttes de soude normale, on amène à 100 cc. et sur 20 cc. on dose le maltose formé par la méthode de M. Gab. BERTRAND. Les résultats se trouvent dans les colonnes IV, V, VI, du tableau précédent.

Aux erreurs d'expériences près, il n'y a pas de différences entre la dextrinase de l'extrait alcalinisé, qu'il soit filtré ou non. Mais l'affaiblissement est de moitié dans la filtration N et de 39/40 environ dans la filtration O.

18. Peroxydiastase. — J'ai trouvé des résultats analogues avec la peroxydiastase du malt. J'ai dû diluer au cinquantième mes solutions diastasiques et n'en prendre qu'une goutte.

Dans une première série d'expériences, j'opère ainsi :

Dans des tubes à essai, on met deux gouttes de diastase, et 2 cc. d'une solution fraîche de gayacol à 1 p. 100. On agite et on ajoute 3 gouttes d'eau oxygénée à 1 p. 100 (obtenue avec 1 cc. de perhydrol de Merk dilué à 100 cc.); on mélange rapidement le tout. On peut aussi mettre d'abord, l'eau oxygénée, puis le gayacol, agiter et alors seulement mettre la diastase, en agitant de nouveau. Des deux manières, on évite le contact de l'eau oxygénée trop concentrée avec la diastase, ce qui détruirait instantanément cette dernière.

Très rapidement il y a oxydation du gayacol. J'ai mesuré les temps nécessaires pour arriver à une teinte rose brune correspondante à la teinte 103 B du « Code des couleurs » de KLINCKSIECK et VALLETTE (2). Les résultats du tableau suivant sont

Nature des diastases	Temps nécessaire pour arriver à la teinte indiquée
O, N, P	1 minute
P filtrée	1, 1/2
N id.	5
O id.	4

(1) J. WOLFF et FERNBACH, *C. R.* **140**, 1403 (1905).

(2) PAUL KLINCKSIECK, éditeur, 3, rue Corneille, Paris.

P a donc le mieux filtré. Chose curieuse dans ces résultats, c'est que la diastase O filtrée soit plus active que N.

J'ai refait la même expérience dans d'autres conditions voici comment :

1 goutte de diastase,

5 cc. de gayacol à 1 %.

5 gouttes d'eau oxygénée à 1 volume.

Le tube N est nettement en retard sur O et P. Le tube N filtré est le plus pâle de tous. Il est impossible de voir une différence entre les tubes O, P et P filtré. Mais il y a une différence très nette entre O et O filtré comme entre N et N filtré.

Comme pour toutes les diastases du malt, c'est encore la réaction la plus alcaline, c'est-à-dire la neutralité à la phénolphthaléine qui a été la plus favorable pour la filtration de la peroxydiastase.

Il y a un point qui frappe dans cette expérience, c'est le peu d'activité des échantillons N et N filtré. J'en ai cherché l'explication d'abord dans la présence de NaCl en traces dans les diastases O et P tandis que N n'avait pas eu d'addition. Ce seraient alors ces traces de NaCl qui favoriseraient l'oxydation, résultats conformes à ceux trouvés par FOUARD (1) : les chlorures alcalins favorisent beaucoup l'oxydation, sans diastase, des phénols comme le gayacol. Peut-être y a-t-il une légère erreur dans la saturation et comme je n'ai pas de tampons dans cette série d'expériences, cette erreur s'est-elle fait particulièrement sentir. Enfin il se pourrait qu'il y ait eu un changement de grosseur de goutte des solutions diastasiques.

(1) FOUARD, *C. R.* **140**, 11, 796 (1906).

CHAPITRE V

DIASTASES D'ORIGINES DIVERSES

A. — EMULSINE

L'émulsine m'a donné, comme on va voir, des résultats intéressants et tout à fait inattendus. J'ai étudié trois espèces d'émulsines différentes : 1° L'émulsine précipitée en poudre de Merck, 2° la macération d'amandes douces, 3° L'émulsine de « l'*Aspergillus niger*. » Les résultats obtenus avec cette dernière ont été décrits au moment où j'ai parlé des autres diastases de cette moisissure.

19. Méthode de Dosage. — On fait agir une solution d'émulsine sur de l'amygdaline au bain-marie. Après un temps suffisamment long, on dose la quantité de HCN produite par la méthode de BURGNET, modifiée par GUÉRIN et BONET (1) et basée sur le fait que les sels cuivriques, même en milieu ammoniacal, donnent avec les cyanures alcalins, un cyanure double de cuivre et d'ammonium.

Ces auteurs ajoutent du sulfite de sodium, qui doit rendre le virage plus sensible (2) et un peu de lessive de soude, qui comme l'a montré DENIGÈS (3) retarde la combinaison d'aldéhyde benzoïque et d'ammoniaque sous forme d'hydro-benzamide insoluble. J'ai réuni tous ces corps en une solution unique :

(1) GUÉRIN et BONET, *J. de Pharm. et Chimie*, **29**, 234 (1909).

(2) Le virage est plus net avec la solution de Guérin et Bonet, mais c'est peut-être parce que leur solution est plus concentrée.

(3) DENIGÈS, *Précis de chimie analytique*, 3^e édition, p. 645, Paris, 1907 (chez Maloine).

SO ³ Na ²	12 gr. 5
Lessive de Na OH à 36° Bé	25 cc.
NH ³ à 22° Bé	250 cc.
H ² O q. s. pour	500

On en prend 20 cc. pour chaque dosage et on ajoute les 10 cc. de la solution de HCN à analyser. Puis on verse aussitôt, avec une burette graduée, une solution de SO⁴Cu + 5H²O à 30 gr. 81 par litre, jusqu'à coloration très légèrement bleue, chaque centimètre cube employé correspondant à 10 mgr de HCN.

20. Emulsine en poudre du commerce. — Une première série d'expériences a été faite avec l'émulsine en poudre de Merck en solution à 1 pour 1.000. Je prenais 10 cc. des solutions filtrées aux différentes réactions, O neutre à l'orangé, P neutre à la phénolphtaléine et N laissée à la réaction naturelle initiale. J'ajoutais 1 gr. d'amygdaline dissoute dans 12.5 cc. d'eau. Le tout, dans des flacons bien bouchés, était placé 1 heure et demie au bain marie à 50°. Je dosais alors sur 10 cc. du liquide la quantité de HCN.

Nature de la diastase.	SO ⁴ Cu	HCN	Dédoublément dû à l'émulsine	
			HCN	% d'amygdaline
N	1.3 cc.	13 mgr.	12 mgr.	54
» filtrée	0.2	1	1	4.4
» bouillie	0.1	1	0	0
P	1.1	11	11	48
» filtrée	0.25	2.5	1.5	6.5
O	1.1	11	10	44
» filtrée	0.15	1.5	0.5	2

Le volume total des flacons était à peu près 23 cc. contenant 1 gr. d'amygdaline.

L'erreur possible dans ces dosages atteint à peu près une goutte de la solution cuivrique ce qui fait 0.5 mgr. de HCN. Comme dans les 10 cc. il y avait primitivement gr. 0.434 d'amygdaline, comme d'autre part une molécule gramme d'amygdaline c'est-à-dire 511 grammes donnent 27 gr. de HCN, le dédoublement,

s'il avait été total aurait donné 23 mgr. de HCN. Donc 0.5 mgr. représentent une erreur de 2 % environ.

Tous les filtrats sont à peu près inactifs, même celui de la portion neutre à la phénolphthaléine. Ce résultat était cependant à prévoir, toutes mes solutions étant fortement opalescentes, même la plus alcaline. Il paraissait donc évident d'attribuer l'inactivité des filtrats à la mauvaise dissolution de l'émulsine.

J'ai d'abord essayé de mieux dissoudre la poudre diastasique en ajoutant très peu de NaCl, mais sans succès. Par contre j'ai eu un résultat parfait en alcalinisant davantage.

Pour 22 mgr. de poudre, il fallait 4 gouttes de NaOH décinormale pour atteindre la neutralité à la phénolphthaléine. J'y ai ajouté 4 gouttes en plus, soit 8 gouttes en tout et j'ai amené le liquide à 10 cc. Ce liquide était limpide. Pour un autre essai, j'ai ajouté à 21 mgr. de poudre 5 gouttes d'eau, puis 10 gouttes de soude. Ce traitement n'a pas affaibli l'émulsine, ainsi que je m'en suis assuré par les dosages suivants, en faisant agir après neutralisation les solutions sur 0 gr. 5 d'amygdaline pendant une heure à 50°.

Quantité de diastase.	Nombre de gouttes de soude n/10	HCN	dédoublement
22 mgr.	8	24 mgr.	90 %
21	10	22	81

La durée de réaction alcaline était d'environ 10 minutes. Il est donc démontré qu'un contact avec très peu de soude ne détruit pas l'émulsine, mais favorise la dissolution de la poudre. Je reprends donc l'expérience et je filtre cette fois la solution alcalinisée en prenant pour dose d'alcali deux fois et demie la quantité de soude nécessaire pour produire la neutralité à la phénolphthaléine. Voici l'expérience : 250 mgr. d'émulsine en poudre de Merck sont triturés avec 1 cc. d'eau et on ajoute peu à peu 125 gouttes de NaOH décinormale, soit environ 6 cc. (car 105 gouttes font 5 cc.) Après la 100^e goutte, j'ai été arrêté dans mon travail et je n'ai ajouté les 25 autres gouttes que 10 à 15 minutes plus tard. Le tout s'est dissous. Comme la réaction est maintenant très alcaline, j'ajoute de l'eau sans perdre de temps de façon à amener le volume à 250 cc. Je prélève exactement 100 cc. de ce liquide. J'ap-

pelle B ces 100 cc. et je procède à la filtration de la façon habituelle. Quand cette première filtration est terminée, je rétablis au même moment la réaction initiale de B, de B filtré et des 150 cc. qui me restaient sur les 250 primitifs; ainsi tous les échantillons ont été soumis le même temps à la forte réaction alcaline. J'appelle N, la réaction obtenue après saturation de l'alcali. C'est la même que celle de la dissolution de poudre d'émulsine, sans addition ni d'acides, ni de bases. Enfin une portion des 150 cc. neutralisée à l'orangé constitue l'échantillon O. Les dosages sont faits sur 10 cc. des diastases agissant pendant 1 heure et demie sur 10 cc. d'une solution contenant 930 mgr. d'amygdaline.

Le tableau indique les chiffres des dosages.

Nature de l'émulsine.	SO ₄ Cu	HCN		Dédoublement de l'amygdaline.	Filtrabilité
		total	dû à l'action diastasique		
B	1.4 cc.	14 mgr.	12.5 mgr.	25.5%	92%
d° filtrée	1.3	13	11.5	23.5	
N	1.4	14	12.5	25.5	
d° filtrée	0.2	2	0.5	1	4
O	1.1	11	9.5	19.4	
d° filtrée	0.15	1.5	0	0	5
N bouillie	0.15	1.5	0	0	

Comme on le voit, la neutralisation au méthylorange a un peu affaibli la diastase O non filtrée. Quant à la filtrabilité, on voit que seule la diastase B, franchement basique, a pu traverser le filtre. Nous avons donc le résultat imprévu que, pour se servir d'une poudre d'émulsine, où probablement la matière protéique a été coagulée par une précipitation par l'alcool, on a intérêt à traiter cette diastase par un alcali si l'on veut filtrer à la bougie. Naturellement, il faut neutraliser après filtration le plus tôt possible l'alcali en ajoutant une solution acide stérilisée et titrée auparavant. Mais encore faut-il opérer comme je l'ai fait : chercher la dose de soude nécessaire pour neutraliser un poids donné d'émulsine. Ajouter très peu d'eau, puis deux fois à deux fois et demi la quantité de soude nécessaire pour neutraliser à la phénolphtaléine, et, aussitôt que le liquide a l'air éclairci, c'est-à-dire après quelques secondes, étendre d'eau aérée. Ensuite on filtre si

l'on veut d'abord sur papier, puis sur bougie et on neutralise aseptiquement.

Il est très probable que les sels alcalins, carbonate de sodium, phosphate trisodique, etc., remplaceront avantageusement la soude.

21. Action des alcalis sur l'émulsine. — Rendons-nous compte de l'alcalinité aux différentes phases de l'opération précédente. J'avais 250 mgr. de poudre d'émulsine, 1 cc. d'eau et 125 gouttes de NaOH décime, soit 6 cc. En tout le volume était environ 7 cc. en ne tenant pas compte du volume de la poudre d'émulsine. Or, pour neutraliser à la phénolphtaléine les 250 mgr. d'émulsine, il fallait environ 50 gouttes de soude. L'alcalinité libre est donc seulement de 75 gouttes, soit environ 4 cc. de NaOH N/10; comme ils sont dilués à 7 cc., la dose d'alcali représente une alcalinité libre de $N/10 \times 4/7$, c'est-à-dire environ vingtième normale. Mais par suite de la présence des matières protéiques servant de tampon, la concentration en ions OH est certainement bien inférieure à ce qu'elle est dans une solution N/20. Seule une mesure électrométrique pourrait en donner la valeur exacte.

Supposons par exemple que la concentration en ions OH soit la même que celle d'une solution de soude cinquantième normale. Quelle sera la vitesse de destruction de l'émulsine dans ces conditions?

Dans le but de rechercher cette vitesse, j'ai broyé 100 mgr. de poudre d'émulsine de Merck non pas avec quelques centimètres cubes de soude cinquantième normale, mais avec 50 cc. de cette soude, de façon à ce que la matière protéique, trop diluée, ne puisse plus jouer un rôle important de tampon. Je prends comme origine de la mesure des temps le moment où le mélange vient d'être fait. Je prélève de temps en temps 5 cc. du mélange que je mets dans des flacons contenant 1 cc. de SO_4H^2 décinormal destiné à neutraliser la soude. La température du mélange était celle du laboratoire. J'ai mis dans chaque flacon 10 cc. d'une solution d'amygdaline à 10 % et chauffé le flacon le temps suffisant au bain marie réglé à 50°. Les chiffres de HCN trouvés sont les suivants :

Durée de contact de l'alcali avec la diastase.	SO ⁴ Cu	HCN	Amygdaline dédoublée
5 minutes	1.8 cc	16 mgr	31 %
8 »	1.3	11	21.3
30 »	0.35	1.5	2.9
60 »	0.25	0.5	1
120 »	0.2	traces	0

Nous voyons donc qu'une alcalinité de soude cinquantième normale ne peut pas être tolérée plus de quelques instants. Aussi dans la dissolution par une alcalinité encore plus forte, vingtième normale, comme celle que j'ai employée, faut-il être prudent et diluer beaucoup la solution aussitôt la dissolution faite. Dans mon expérience, de 7 cc. j'ai amené le volume rapidement à 250 cc., donc la solution passait d'une concentration en alcali vingtième normale à une concentration environ N/600, ou plutôt encore plus faible à cause du CO² dissous dans l'eau, et des matières protéiques. Cette réaction n'est donc plus dangereuse et on a tout le temps de procéder à la filtration.

22. Emulsine du lait d'amandes douces. — Je prépare une solution d'émulsine d'après le procédé habituel tel qu'il est par exemple décrit par HÉRISSEY (1).

75 gr. d'amandes douces, mondées en les plongeant dans l'eau bouillante une minute, sont triturées dans un grand mortier avec 225 cc. d'eau ajoutée peu à peu. On passe sur une toile, puis on précipite les caséines en ajoutant de l'acide acétique cristallisable. HÉRISSEY en prenait très peu, 10 ou 20 gouttes; j'ai opéré ainsi, mais voyant que le filtrat continue toujours à précipiter par l'acide acétique, j'ai essayé avec plus d'acide, jusqu'à 70 et 80 gouttes (un centimètre cube faisant 70 gouttes d'acide acétique). 5 cc. des solutions diastasiques à différentes réactions, filtrées et non filtrées, sont ajoutées à 10 cc. d'une solution d'amygdaline à 10 % dans des flacons bien bouchés, le tout placé pendant 30 minutes au bain marie à 50°. Dans certaines expériences, j'ajoutais un tampon; je préparais la solution suivante :

(1) HÉRISSEY, Recherches sur l'émulsine, *Thèse pharm.*, Paris, 1899.

Acétate de sodium	0 gr. 600
Acide acétique cristallisable	0 cc. 5
Amygdaline	11 gr. 2
Eau	100 cc.

ce qui donne environ 110 cc.

Voici les résultats de deux séries d'expériences.

EXPÉRIENCE I

Diastase	SO ₄ Cu cc.	HCN		Amygdaline dédoublée %	filtra- bilité.
		total mgr.	du à la diastase mgr.		
N	2.25	22.5	20.5	39	95 %
N filtrée	2.15	21.5	19.5	37	
O	2.65	26.5	24.5	46	
O filtrée	2.55	25.5	23.5	44	95
P	0.7	7	5	9.5	
P filtrée	0.65	6.5	4.5	8.5	90
N bouillie	0.2	2	0	0	

Comme on le voit, la filtrabilité fut à peu près la même dans ces trois réactions usuelles, toutefois dans une seule série d'expériences, la série suivante, j'ai eu une émulsine ne filtrant pas à la réaction N; les caséines y étaient particulièrement bien éliminées et 80 cc. du liquide précédent dilués à 200 cc. La concentration était donc bien moindre.

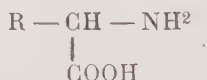
EXPÉRIENCE II

Diastase	SO ₄ Cu cc.	HCN		Amygdaline dédoublée %	Filtre- bilité
		total mgr.	du à la diastase mgr.		
N	4.2	42	40.5	77	1.3 %
N filtrée	0.2	2	0.5	1	
O	4.1	41	39.5	75	
O filtrée	2.0	20	18.5	35	47
P	3.8	38	36.5	69	
P filtrée	3.7	37	35.5	67	97
N bouillie	0.15	1.5	0		

Il paraît surprenant que l'échantillon O ait mieux filtré que N. Peut-être y a-t-il eu en N un optimum de coagulation ou d'adsorption. Je vais chercher à expliquer ces phénomènes dans les derniers chapitres.

B. — DIASTASES PROTÉOLYTIQUES

23. Dosage des acides aminés d'après SOERENSEN (1). — On peut évaluer l'activité de la pepsine de deux façons : soit par la vitesse de solubilisation d'une matière protéique, soit par la mesure de la quantité d'acides aminés produits. Le deuxième procédé, grâce à l'excellente méthode de SOERENSEN, est le seul précis. Il consiste à titrer avec de la soude, en présence de formol, les groupes carboxyles formés. On sait en effet que les acides aminés sont caractérisés par le groupement.

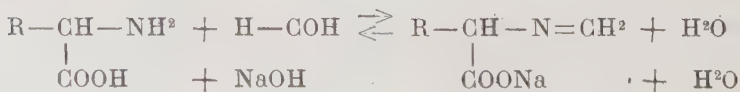


Comme le groupement acide et le groupement alcalin se neutralisent, une solution de ce corps dans de l'eau pure sera sensiblement neutre.

Si maintenant, comme le fait SOERENSEN, nous ajoutons de l'aldéhyde formique, il se produira la réaction suivante :



qui donne une combinaison méthylénique où persiste seule la fonction acide. La solution devient donc franchement acide et par un simple titrage acidimétrique à la soude, avec un indicateur coloré, on aura le nombre de groupements COOH dans la solution. La réaction est donc :



(1) SÖRENSEN, *C. R. Lab. de Carlsberg VII*, 1 (1907).

Mais elle est limitée par la réaction inverse. On a un équilibre dépendant de la quantité de substances en jeu. La réaction sera d'autant plus complète, c'est-à-dire marchera d'autant plus de gauche à droite que la quantité d'eau sera plus faible et la quantité de formol plus grande, mais l'augmentation de la soude produira le même effet. Il en résulte qu'il faut prendre un indicateur virant à un point très alcalin. Nous devons donc ne pas prendre le méthylorange, mais la phénolphtaléine.

Pratiquement, on prépare la solution suivante :

Solution de formol du commerce à 35 %	500 cc
Phénolphthaléine dans 5 cc d'alcool	0 gr. 05

Cette solution doit être neutralisée avant chaque série d'expériences.

On en prélève 10 cc. qu'on commence par neutraliser exactement à la soude cinquième normale, ce qui donne l'acidité libre, puis on ajoute 10 cc de notre solution au formol et on continue à verser de la soude cinquième normale, ce qui nous donne la quantité d'acides aminés.

24. Pepsine. — J'ai pris (1) une pepsine commerciale en paillettes, titre 100 du Codex. La dissolution à la dose de 2 gr. de pepsine dans 180 cc. d'eau distillée est presque neutre au méthylorange. J'ai d'abord filtré trois solutions : une neutre au méthylorange, fortement opalescente; une autre franchement acide contenant 2 pour 1.000 de HCl, sensiblement plus limpide; et enfin une troisième neutre à la phtaléine, cette dernière presque limpide. Pour doser l'activité de ces solutions filtrées ou non filtrées, on en fait agir 5 cc. sur 2 gr. de fibrine sèche du sang (produit du commerce) gonflée au bain marie avec 50 cc. d'eau et contenant une dose de HCl telle que le tout présente une acidité de 2 pour 1.000 de HCl. On dose après 4 heures et après 17 heures de séjour au bain marie réglé à 50°, les acides aminés produits sur 10 cc. d'après la méthode de SORENSEN. Le tableau suivant donne les quantités de soude décimale nécessaires pour produire la neutralisation des acides aminés contenus dans 10 cc.

(1) M. HOLDERER, *C. R. Acad. des Sciences*, **150**, 790 (1910).

N°	Réaction de la pepsine au moment de la filtration	Soude décinormale	
		Après 4 heures cc	Après 17 heures cc
1	2 ‰ HCL	4.1	4.7
2	id filtrée	3.8	4.3
3	id bouillie	(0) Indosable	(0) Indosable
4	O neutre orangé	3.6	4.5
5	id filtrée	Indosable	0.8
6	P neutre phtaléine	2.2	3.2
7	id filtrée	2.5	2.9

L'aspect du contenu des flacons est très différent. Tandis que 1, 2, 4 sont liquéfiés en quelques minutes, 6 et 7 demandent un peu plus de temps. 5 est encore très pâteux après 4 heures : en couchant ce flacon, la masse s'écoule très lentement. Enfin 3, après 4 heures peut être retourné sans que la masse s'écoule.

Il résulte nettement de ces expériences que si la filtration se fait en milieu neutre au méthylorange, le filtrat est presque complètement inactif. Mais en milieu franchement acide, à 2 p. 1.000 de HCl, la pepsine traverse très bien les bougies. Il en est de même en milieu neutre à la phénolphtaléine, mais cette réaction trop alcaline a beaucoup affaibli la pepsine, aussi bien filtrée que non filtrée.

25. Action des sels. — La pepsine dont je me suis servi, dissoute dans très peu d'eau distillée, donne une solution jaunâtre, mais assez limpide, comme du sérum par exemple. Mais en ajoutant de l'eau, elle se trouble d'autant plus que la dilution est plus grande, au moins jusqu'à une certaine limite. A la concentration où j'ai opéré, c'est-à-dire à 1,1% environ, la solution est blanchâtre, nettement trouble. J'ai dit qu'elle est presque neutre au méthylorange, car à 5 cc. de cette solution, il suffit d'une ou deux gouttes de HCl dilué (correspondant à NaOH n/10) pour produire le virage au méthylorange. Si l'on filtre sans aucune addition, c'est-à-dire à une réaction presque neutre au méthylorange, ou très peu alcaline, le filtrat est également inactif. L'état opalescent semble indiquer que la pepsine n'est pas bien dissoute dans l'eau à cette dilution. J'ai donc essayé d'ajouter un pour cent de sulfate

d'ammoniaque, ce qui a nettement clarifié la solution, par dissolution des globulines. La pepsine a alors très bien traversé la bougie comme le montre le tableau suivant. Les dosages y sont faits exactement dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente.

Nature de la pepsine	NaOH n/10 employé pour 10 cc du liquide	
	après 4 heures	Après 17 h.
Bouillie	0	0
Filtrée sans addition	1.6	2.0
» avec 1 % de SO^4Am^2	5.0	5.9
Non filtrée.	5.2	6.1

Ces résultats ont été confirmés et étendus par FUNK et NIEMANN (1) qui poussèrent la dilution plus loin. Ils sont ainsi arrivés à ce résultat qu'à une concentration de 5 grammes par litre, la pepsine filtre encore si on ajoute 1 % de sulfate d'ammoniaque, tandis qu'à une concentration de 4 gr. par litre, le sulfate d'ammoniaque ne peut plus faire passer la pepsine à travers le filtre.

Nous avons donc, avec la pepsine précipitée par l'alcool, un premier exemple d'une diastase qui se trouve elle-même sous forme colloïdale, ou bien fixée sur un support colloïdal. Si les micelles de ce colloïde sont très petites, la pepsine traversera les bougies. Si les micelles sont grosses, elles seront retenues et la diastase ne passera pas. J'apporterai plus loin la démonstration que c'est bien la grosseur des micelles qui intervient et non pas un phénomène de teinture de la bougie par la diastase, comme cela se produit par exemple pour la sucrase d'*Aspergillus niger*.

26. Trypsine. — Je me suis servi d'une trypsine du commerce (pancréatine Macquaire en poudre) obtenue par précipitation par l'alcool. Ma solution était environ à 0.75 % et filtrée sur papier. Ce filtrat est bien limpide, 10 cc. de ce liquide avec une goutte de phénolphthaléine virent au rose avec 15 gouttes de NaOH n/10. En présence de méthylorange, il faut, pour 10 cc. de liquide, 5 gouttes de HCl correspondant à la soude n/10 pour

(1) CASIMIR FUNK et ALBERT NIEMANN, *Z. f. physiol. Chim.*, **68**, 263 (1910).

donner une teinte rose. Ce dernier liquide est devenu trouble pendant l'acidification. Les doses sont pour les échantillons :

O	80 cc + 40 gouttes HCl.
P	80 cc + 120 » NaOH
B	80 cc + 240 » »

Les essais ont été faits comme pour la pepsine avec 2 gr. de fibrine en poudre, 40 cc. d'eau et 10 cc. des solutions diastasiques. Le mélange macère 3 heures au bain marie réglé à 40° en agitant souvent les flacons, surtout au début. Après 3 heures de digestion, je dose les acides aminés comme pour la pepsine. Voici les résultats obtenus :

Nature de la trypsine au moment de la filtration	NaOH n/10		Filtrabilité (1)
	total	dû à l'action diastasique	
O neutre à l'Orangé	3.3 cc	2.2	4 %
d° filtrée	1.2	0.1	
P neutre à la Phtaléine	3.9	2.8	75 %
d° filtrée	3.2	2.1	
B Basique à la Phtaléine	4.0	2.9	82 %
d° filtrée	3.5	2.4	
Témoin bouilli	1.1	0	

On voit que c'est en milieu franchement alcalin que la trypsine passe le mieux à travers la bougie. La neutralisation au méthyl-orange a bien affaibli la trypsine. Un tampon artificiel est inutile parce que la fibrine en tient lieu.

27. Papaine. — Je me suis servi du suc sec du papayer (*Carica papaya*) aimablement mis à ma disposition par la maison Trouette et Perret.

Pour 300 cc. d'eau, j'ai pris 6 grammes de suc que j'ai broyé et trituré avec très peu d'eau d'abord, le liquide trouble est décanté; on recommence avec une nouvelle portion d'eau jusqu'à ce

(1) J'appelle filtrabilité d'une diastase le rapport de l'activité du filtrat à celle de la diastase non filtrée.

que toute la papaïne soit émulsionnée dans les 300 cc. d'eau. Cette solution est filtrée sur papier, 5 cc. de filtrat, en présence de phénolphtaléine virent au rose après 7 gouttes de NaOH n/10.

En présence du méthylorange, il faut 6 gouttes de HCl. J'ai fait un échantillon que j'ai neutralisé au méthylorange, un autre P à la phénolphtaléine et un troisième B auquel j'ai ajouté deux fois plus de soude qu'à l'échantillon P. Les dosages ont été faits avec 2 gr. de fibrine en poudre, 10 cc. des liquides diastasiques et 40 cc. d'eau, ce mélange macérant au bain marie réglé à 40°. Les acides aminés furent dosés comme précédemment.

Nature de la papaïne au moment de la filtration.	Na OH n/10		Filtrabilité
	total	dus à l'action dias- tasique seule.	
O	5.3 cc	3.8 cc	100 %
O filtré	5.3	3.8	
P	5.3	3.8	
P filtrée	5.2	3.7	97 %
B	5.1	3.6	
B filtrée	5.1	3.6	100 %
Temoin bouilli	1.5	0	

Le résultat est donc autre que celui obtenu jusqu'ici : en toute réaction, la papaïne a traversé le filtre. Mais il est utile de remarquer qu'il y a eu une filtration préliminaire sur papier et que j'opérais avec une solution très concentrée (2 %). De plus le suc de « *Carica papaya* » est très riche en matières albuminoïdes qui comme nous le verrons plus loin, favorisent souvent la filtrabilité des diastases.

28. Action du blanc d'œuf. — 240 cc. d'une solution contenant 2 % de papaïne et un blanc d'œuf sont sans filtration préalable sur papier, filtrés directement sur bougie Chamberland F à la réaction O et B, définies précédemment. Un témoin est bouilli, mais avant d'ajouter le blanc d'œuf pour éviter le phénomène de digestion rapide signalé par POZERSKI (1). 10 cc. du liquide sont

(1) E. POZERSKI, *La papaïne*, Thèse sciences naturelles, Paris, 1908.

mis en contact avec 20 cc. de blanc d'œuf dilué de moitié. La concentration en papaïne lors de la filtration n'est ici que de 0,66 %. Voici les nombres obtenus pour 10 cc.

Nature de la diastase.	Après 3 heures Na OH n/10		Après 6 heures. Na OH n/10	
	total	dû à la diastase.	total	dû à la diastase.
O	2.85	0.4	3	0.4
O filtrée	2.45	0	2.65	0.05
B	2.6	0.15	2.9	0.3
B filtrée	2.4	0.05	2.6	0
bouillie	2.45	0	2.6	0

Y a-t-il eu par le blanc d'œuf colmatage de la bougie, empêchant la filtration de la diastase? L'expérience suivante nous renseignera :

On laisse pendant une heure en contact à la température ordinaire, 4 gr. 8 de papaïne et 150 cc. d'eau; on filtre sur papier et on ajoute 90 cc. d'eau contenant un blanc d'œuf. Le dosage des papaïnes se fait avec 2 gr. de fibrine, 30 cc. d'eau et 10 cc. de diastase; j'ai obtenu les résultats suivants après 3 heures pour 10 cc. du liquide de digestion.

Nature de la papaïne.	Na OH n/10		Filtrabilité
	total	dû à la diastase	
O	5.3	3.3	87 %
O filtrée	4.9	2.9	
B	4.8	2.8	
B filtrée	4.3	2.3	82 %
bouillie	2.0	0	

Cette expérience diffère de la précédente par la forte « concentration » de la solution en papaïne qui est de 2 % au lieu de 0,66 %. Cette augmentation de concentration a suffi à rendre filtrable la diastase considérée.

29. Présure.—Expériences de Casimir Funk et A. Niemann. (1).

— Les expériences sur la filtration de la présure ne me sont pas personnelles. Elles ont été faites par FUNK et NIEMANN, qui ont employé ma méthode de filtration à différentes réactions pour séparer la présure de la pepsine. Je me contente donc de résumer brièvement les résultats obtenus par ces auteurs.

Le suc gastrique du chien, de l'homme et du nourrisson, dilué assez fortement donne des filtrats inactifs quelle que soit la réaction.

La présure de Grübler à la concentration de 4 p. 1.000 n'est filtrable qu'à la réaction P neutre à la phénolphtaléine avec une filtrabilité de 100 %.

Le citrate acide et l'acétate de sodium rendent filtrables la pepsine à 4 p. 1.000 de Grübler et la présure de Witte. Les deux filtrats sont actifs tant au point de vue de la présure qu'à celui de la pepsine. Avec NaCl et $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$ les filtrats de pepsine Grübler à 4 pour 1.000 sont inactifs à la réaction O neutre à l'orangé, mais ils sont actifs au moins pour le $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$ si la concentration est plus forte, c'est-à-dire de 5 p. 1.000. Par contre il a été impossible de voir la présure et la pepsine d'un même liquide se comporter différemment dans les filtrations : quand l'une des diastases était retenue, ou passait, l'autre se comportait de même.

Cependant, en ce qui concerne le présent travail, l'effet favorable que j'ai signalé de la réaction neutre à la phtaléine et du $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$ est confirmé et étendu par ces auteurs à la présure.

C. — CATALASE

30. Sa filtration (2). — On passe au hache-viande 250 gr. de panne de porc fraîche et on recueille environ 150 gr. d'une masse blanche bien homogène. Comme il est difficile de la broyer avec

(1) CASIMIR FUNK et ALBERT NIEMANN, Ueber die Filtration von Lab und Pepsin, *Zeitsch. f. Physiolog. Chemie* **68**, 263-272 (1910).

(2) M. HOLDERER, *C. R.* **150**, 790 (1910).

de l'eau au mortier, on triture avec les doigts la masse à laquelle on a ajouté 500 cc. d'eau distillée. Le liquide obtenu est très pauvre en sels qui servent de tampons, car 10 cc. virent à la phénolphthaléine avec une seule goutte de NaOH n/10 et à l'orangé avec 2 à 3 gouttes de HCl. Pour doser l'activité diastasique, on ajoute à 1 cc. de diastase dans des tubes à essais à froid, 2 cc. d'eau pour laver les parois du tube, puis 5 cc. d'une solution d'eau oxygénée contenant 2 cc. 5 de perhydrol de Merck dans 100 cc. On agite. Si la diastase est active, de petites bulles d'oxygène montent rapidement à la surface. Après 9 minutes, l'action diastasique est arrêtée en acidifiant le mélange. On dose alors H_2O_2 décomposé, avec une solution de KMnO_4 à 5 pour 1000.

Nature de la catalase.	KMnO_4 à 5 ‰		H_2O_2 dédou- blée.	Filtrabilité
	total	correspondant à l'activité diastasique.	%	
O	4.75	10.75	69.0	} 0.19 %
O filtrée	15.3	0.2	0.43	
P	4.3	11.2	72.2	} 67 %
P filtrée	8	7.5	48.2	
N bouillie	15.5	0	0	

5 cc. de la solution d'eau oxygénée, sans diastase décomposent 15 cc.5 de KMnO_4 .

La filtrabilité de P est très grande en comparaison de celle de O : 67 % au lieu de 0.19 %, c'est-à-dire 350 fois plus grande. Peut-être même cette différence aurait-elle été encore plus grande si j'avais opéré en présence de tampons. En tous les cas, le contact plus prolongé de l'alcali, avant de procéder à la filtration, n'augmente pas la filtrabilité de la diastase. Dans l'expérience précédente, ce contact était de 25 minutes. Dans une autre série, il a duré 2 heures 20 minutes et l'écart entre P et P filtré a été plus grand encore, la filtrabilité n'était que de 31 %. Peut-être y a-t-il eu absorption de CO_2 de l'air rendant la réaction moins alcaline

CHAPITRE VI

THÉORIES DE LA FILTRATION

Comment peut-on maintenant interpréter les faits que j'ai observés ? Enumérons rapidement les diverses explications possibles. J'indiquerai d'abord deux facteurs auxquels je ne crois pas devoir m'arrêter pour passer ensuite à ceux qui méritent une discussion approfondie.

31. Etat plus ou moins glissant des parois filtrantes. — On sait qu'une surface alcalinisée est toujours glissante au toucher; en acidifiant, la surface perd cette propriété, au moins tant que l'acidité n'est pas excessive. On peut même ainsi, par le toucher, apprécier grossièrement le passage de la réaction alcaline à la réaction acide.

Il me paraît peu probable que ce facteur intervienne car la différence des réactions que j'ai considérées n'est pas si grande qu'elle puisse produire une modification sensible de l'état glissant de la paroi filtrante.

32. Action des sels. — Pendant la filtration il se produit une force électro-motrice de filtration qui, comme l'ont montré les expériences de PIERRE GIRARD, s'oppose à la diffusion des sels en réaction acide, surtout s'il n'y a pas de sels à ions polyvalents diminuant la force électro-motrice de filtration.

A première vue, on pourrait se laisser tenter par cette explication, d'autant plus que les solutions diastasiques ou les toxines concentrées et riches en sels à ions polyvalents traversent mieux les bougies que les solutions diluées. Mais une expérience simple démontre qu'il faut chercher l'explication ailleurs. En effet, j'ai fait bouillir de la sucrase active et ajouté ce liquide, qui contenait tous ses sels, à la macération d' « *Aspergillus niger* » filtrée à la réaction neutre au méthylorange. Le mélange reste inactif.

De même, pourrait-on dire, l'addition de soude, augmente la teneur en sels des solutions. Ce seraient peut-être ces traces de

sels qui rendraient solubles les globulines diastasiques. Cette hypothèse doit être écartée. Comment expliquer autrement les résultats de FUNK et NIEMANN? Une solution de pepsine à plus de 5 pour 1000, non filtrable par elle-même, le devient par addition de 1 % de sulfate d'ammonium, tandis que la même pepsine à 4 pour 1000 et moins ne peut plus être rendue filtrable dans les mêmes conditions ! La solubilisation des globulines hypothétiques des diastases ne suffit donc pas; il y a autre chose, ce qui nous amène maintenant aux deux principaux facteurs, qui souvent interviennent tous les deux.

33. Effet de l'adsorption . — Suivant la réaction, l'adsorption pourrait se faire ou non. Des phénomènes de teinture ou d'affinité interviendraient entre la diastase (ou son support colloïdal) et la bougie.

Je pense dans ce qui suit, apporter la preuve que les choses se passent réellement ainsi pour presque toutes les diastases.

34. Grosseur des micelles colloïdales. — L'idée que la grosseur des micelles colloïdales pouvait intervenir dans la filtrabilité des diastases, a été le point de départ de mes expériences. Les colloïdes que l'on rencontre dans le règne végétal et animal sont en général négatifs. Ils sont solubilisés par les alcalis et coagulés par les acides, ou du moins il existe une réaction de coagulation maxima. Peut-être, suivant leur grosseur les micelles pourront soit passer à travers les pores des filtres, soit être retenues. On comprend que l'autodigestion, les solubilisants et les coagulants interviennent ici.

Cette explication est celle qu'il faut adopter pour quelques diastases, en particulier pour celles qui sont insuffisamment dissoutes. Il est évident qu'une émulsion trouble ne peut pas traverser une bougie. Les particules en suspension sont retenues par une filtration grossière et dans ce travail je me place à un point de vue tout différent.

Pour juger du rôle de ces deux facteurs (adsorption et grosseur des micelles colloïdales) dans l'arrêt des diastases j'étudierai particulièrement la sucrase d'*Aspergillus niger* et la pepsine précipitée en poudre.

CHAPITRE VII

APPLICATION DE CES THÉORIES A DIVERSES DIASTASES

Si l'état de grosseur des micelles intervient, l'auto-digestion de la sucrase doit la rendre plus filtrable. J'ai donc soumis une culture à une macération très prolongée.

35. Sucrase par autodigestion de l'*Aspergillus*. — Quand la durée de macération est augmentée, on remarque que le liquide se colore de plus en plus; d'incolore qu'il est après 7 heures, il devient légèrement verdâtre après 15 heures, puis jaune et de plus en plus brun. Quand on examine combien il faut de NaOH pour neutraliser 10 cc. de la macération à la phénolphthaléine, cette quantité reste à peu près constante, 5 à 6 gouttes. Dans certains cas, on peut avoir une macération neutre et même alcaline à la phénolphthaléine. Par contre, la quantité de HCl, nécessaire pour neutraliser la solution au méthylorange augmente de plus en plus, j'ai trouvé 60 gouttes par exemple pour une macération de 3 jours.

Pour faire la neutralisation au méthylorange, on se heurte à une difficulté. Le sucrase des vieilles macérations est très colorée, elle contient des spores et une matière colorante rouge brun en solution alcaline qui vire au jaune verdâtre en solution acide. Le virage est un peu alcalin au méthylorange; si les spores sont en grande quantité dans le liquide, elles troublent la solution et il sera impossible de bien observer les virages. J'ai essayé d'enlever les spores par filtration sur papier. Elles traversent le papier très facilement. Cependant en acidifiant le liquide, les spores sont aisément retenues et comme la matière colorante du liquide a viré au jaune serin, j'ai pensé d'abord que la solution

était décolorée. Il n'en est rien, car en alcalinisant à nouveau, on retrouve la couleur initiale, mais sans spores.

En tous les cas, si l'on veut que la sucrase soit retenue par la bougie, il faudra, surtout pour les vieilles macérations, ne pas aller seulement jusqu'au début du virage au méthylorange, mais ajouter de l'acide chlorhydrique jusqu'à une couleur franchement rose, presque rouge. La sucrase n'est pas affaiblie par cette forte acidité. Je donnerai un exemple où la sucrase auto-digérée se trouve retenue en milieu acide.

Si l'on admet que les diastases sont des solutions colloïdales, tout ce qui favorisera la dissolution doit favoriser la filtrabilité de la diastase. Le support colloïdal de la sucrase est très probablement de nature protéique. Or, nous savons que la digestion des protéines les solubilise de plus en plus. Peut-être la sucrase fortement auto-digérée filtrera-t-elle à la réaction neutre au méthylorange.

Étudions donc maintenant la sucrase obtenue après macération prolongée, soit pendant 5 jours et demi à l'étuve à 34°. Cette sucrase alcaline à la phtaléine est filtrée d'abord à cette réaction, ce qui ne lui fait rien perdre de son activité, puis on filtre aux réactions neutres à l'orangé et à la phtaléine.

Le dosage fait sur 2 cc de sucrase a donné les chiffres suivants :

Diastase	Sucre interverti en 85 minutes à 56°			Filtrabilité
	total	par la diastase seule		
	mgr	mgr	%	
O	511	471	44.5	0 %
O filtrée	40	0	0	
d° bouillie	40.5	0	0	
P	520	480	45.5	100 %
P filtrée	532	492	46.5	

La digestion n'a donc pas favorisé du tout la filtrabilité à la réaction acide, ce qui ne concorde pas avec l'idée d'une intervention de l'état colloïdal de cette diastase.

36. Action des sels. — Nous savons que les sels, surtout à forte concentration, sont des agents de coagulation. Quel sera l'effet du NaCl par exemple ?

A 30 cc de sucrase « d'*Aspergillus niger* », d'une macération de 20 heures à 33°, on ajoute soit 15 cc d'eau distillée, soit 15 cc d'une solution de NaCl à 24 %. Les mélanges salés sont filtrés aux trois réactions usuelles, la réaction acide ne faisant virer le méthylorange qu'au rose léger. Le dosage avec 2 cc. de diastase est fait à la façon habituelle en veillant à ce que dans tous les tubes il y ait la même réaction (saturation et tampons) et la même concentration en NaCl. Le tableau donne les résultats obtenus :

		Sucre réducteur produit			
Diastase	KMnO ⁴	total	par la diastase seule		filtrabilité
		mgr	mgr	%	
N	13.6	74.2	52.8	12.5	100
N filtrée	13.9	76	54.6	13	
N salée	13.6	74.2	52.8	12.5	
id filtrée	12.9	69.9	48.5	11.5	93
N bouillie	4.3	21.4	0	0	
P salée	13.4	73.2	51.8	12.3	96
id filtrée	13.0	70.9	49.5	11.8	
O salée	12.7	68.7	47.3	11.2	
id filtrée	12.3	66.6	45.3	10.7	96

Cette diastase a donc filtré à toutes les réactions. Si le sel a un effet coagulant, comme les solutions contenaient 8 % de NaCl, nous aurions dû avoir arrêt complet déjà à la réaction naturelle et à fortiori à la réaction neutre à l'orangé.

Je n'oserai pas affirmer que le sel a été au contraire favorable à la filtrabilité, car j'ai eu des sucres qui traversaient la bougie à la réaction presque neutre au méthylorange; en tous les cas, la présence de ce sel n'a nullement empêché la filtration. J'ai refait cette même expérience avec la même diastase.

20 cc. de solution diastasique sont neutralisés au méthylorange jusqu'à coloration fortement rose; la même neutralisation est faite sur 20 autres cc. additionnés de 10 cc. d'eau pure ou d'eau salée à 24 %. Pour la solution salée, il faut à cet effet 7 gouttes de

HCl n/10 et pour les deux autres 8 gouttes. Le dosage se fait sur 2 cc de la sucrase non diluée et sur 3 cc pour les autres. Les résultats sont conformes aux précédents, comme on le voit par le tableau :

Sucrase	Filtration de la sucrase	
	Réaction nettement rose au méthylorange	
	KMnO ₄	filtrabilité
I non diluée	12 cc 5	0 %
id filtrée	4.75	
Etendue d'eau	12.3	0 %
id filtrée	4.75	
Salée et étendue	12.8	34 %
id filtrée	7.65	

L'échantillon bouilli aurait donné probablement 4 cc 75. Nous voyons encore que 8 % de NaCl a été plutôt favorable à la filtrabilité.

Nous ne pouvons donc pas admettre, au moins dans le cas présent, le rôle de la grosseur des micelles dans la non filtrabilité. En effet, l'auto-digestion ne favorise pas la filtration et la présence de 8 % de NaCl, au lieu de l'empêcher, semble plutôt lui être favorable. A. FROUIN a observé l'effet contraire pour différentes diastases, à condition d'employer des concentrations assez fortes : de 5 à 10 10 % par exemple (1). Je pense que pour tout un groupe de diastases, FROUIN a raison, c'est le groupe des diastases où la grosseur des micelles intervient.

37. Action de l'albumine. — J'avais déjà étudié l'action du blanc d'œuf sur l'émulsine d'amandes douces. Cette diastase, assez concentrée, traverse les bougies à toutes les réactions. Je pensais pouvoir colmater la bougie par le blanc d'œuf et empêcher le passage de la diastase. Il n'en a rien été, l'émulsine continuant à traverser la bougie à toutes les réactions.

La sucrase « d'*Aspergillus niger* », au contraire, m'a donné des résultats qui, comme on va le voir, sont très intéressants à beaucoup de points de vue, seulement ils sont tout autres que ceux auxquels je m'attendais.

(1) Communication verbale.

Je me suis servi du blanc d'œuf, qui, d'après ARMAND GAUTIER (1), contient 12 % d'albumine. 12 cc. de blanc d'œuf tamisé sur toile métallique sont additionnés de 10 cc de sucrase d'une macération de 5 jours (auto-digérée). On filtre sur papier d'abord, puis sur bougie aux réactions neutres à l'orangé et à la phtaléine et on a les chiffres suivants :

Sucrase albuminée	Dosage fait sur	KMnO ⁴	Sucre réducteur produit			Filtrabilité
			total	par la diastase		
				mgr	mgr	
O	10 cc.	11.4 cc.	304	259	24.5	100 %
O filtrée	10	11.5	307	262	24.8	
O bouillie	20	3.6	45	0	0	
P	10	11.25	300	255	24.1	100 %
P filtrée	10	11.25	300	255	24.1	

On obtient exactement les mêmes résultats en acidifiant séparément l'albumine et la sucrase et en ne faisant le mélange qu'après coup. De même l'emploi de sucrase d'une macération courte (20 heures à 33°) ou l'addition de NaCl ne change pas les résultats.

38. Réaction intermédiaire. — On sait qu'en dissolvant l'albumine dans de l'eau distillée le mélange est alcalin à la phénol-phtaléine. Si maintenant on ajoute progressivement de l'acide, HCl par exemple, il y aura à un moment donné, voisin du point de neutralité au tournesol, un trouble abondant qui, dans un excès d'acide se redissoudra. A la neutralité au méthylorange, la solution est à nouveau limpide.

Que se passera-t-il si nous filtrons à la réaction intermédiaire qui correspond à ce trouble maximum ?

On bat et on tamise du blanc d'œuf dilué de son volume d'eau, 40 cc de ce liquide sont ajoutés à 80 cc de sucrase « d'Aspergillus » et on étend à 200 cc, le tout est jeté sur un filtre sec.

On prépare 2 portions de 50 cc du filtrat. 1° Dans la première,

(1) ARMAND GAUTIER, *Traité de chimie*, t. III.

on verse progressivement des gouttes de HCl normal. Après 9 gouttes, on observe un léger trouble qui est maximum à 17 gouttes et après 22 gouttes, il a totalement disparu. A ce mélange encore alcalin au méthylorange, on ajoute encore 8 gouttes, c'est-à-dire en tout 30 gouttes pour être fortement rouge au méthylorange. Cet échantillon servira à démontrer à nouveau qu'à la neutralité au méthylorange, la sucrase est filtrable en présence d'albumine.

2° A 50 cc du même filtrat que ci-dessus, on ajoute 16 gouttes de HCl. Le liquide est fortement trouble. Il sera désigné par N.

On prend 5 cc des différents liquides filtrés et non filtrés et on les fait agir à 56° sur 5 cc de solution sucrée à 20 % de saccharose, 2 % d'acide acétique et 0.3 % d'acétate de sodium.

Après 70 minutes de contact, on neutralise à la phtaléine, avec quelques gouttes de lessive de soude et on procède au dosage. 2 cc de liqueur de FEHLING (formule de G. BERTRAND) sont réduits par le nombre de gouttes suivantes des différents tubes (liquides non dilués).

Nature de la sucrase		Nombre de gouttes nécessaires à décolorer 2 cc de Fehling	Filtrabilité
avec albumine	N	7	100 %
	N filtrée	7	
	O	6	100 %
	O filtrée	6	
sans albumine	O bouillie	> 120	0 %
	O	7	
	O filtrée	> 120	

Dans le bas du tableau se trouve à titre de témoin un échantillon de la même sucrase, à la même dilution (20 cc de sucrase + 30 cc eau) mais sans albumine. La sucrase a été retenue totalement.

Je ne donne ici que ces expériences. J'en ai fait d'autres avec de la sucrase d'une macération de 20 heures à 33°. Les résultats ont été les mêmes.

39. Action de la peptone. — Il était intéressant de voir si la peptone produirait les mêmes effets que le blanc d'œuf. On filtre

à la bougie 100 cc de sucrase, additionnée de 1 % de peptone en poudre (Chapoteaut) et neutralisée au méthylorange jusqu'à teinte rose. Les dosages sont faits à la façon habituelle.

Sucrase	2 cc de Fehling sont réduits par	Filtrabilité
O peptonée	5 gouttes	100 %.
id. filtrée	5 gouttes	
id. bouillie	150 environ	

Cette expérience ne fut faite qu'une seule fois. La peptone peut donc jouer le même rôle que le blanc d'œuf pour faciliter la filtrabilité de la sucrase.

40. Bougies albumineuses. — Pour me rendre compte du mécanisme de l'action de l'albumine, il m'a paru intéressant de filtrer sur une même bougie une solution d'albumine et ensuite une solution de sucrase, les deux liquides étant neutres au méthylorange.

La solution d'albumine contient 1 volume de blanc d'œuf pour 3 volumes d'eau. Elle est tamisée, filtrée sur papier Chardin, puis sur papier ordinaire et enfin acidifiée par HCl. Le volume d'albumine filtrée à la bougie est 16 cc; le filtrat est nettement rose au méthylorange.

On filtre ensuite une solution de sucrase. Les premiers 5 cc. sont rejetés comme étant surtout formés par l'albumine chassée des pores de la bougie. Puis on recueille le filtrat par portions de 5 cc. environ. On dose l'activité de chaque portion sur 2 cc.

N°	Liquides recueillis successivement à la filtration.	Nombre de gouttes réduisant 2 cc de Fehling.
0	non filtré	12 gouttes
1	5 cc du filtrat	pas dosé
2	5,5 »	14
3	5,6	12
4	5,2	12
5	5,1	12
6	5,6	12
7	15	pas dosé
8	5,2	12
d° bouilli		> 100

Ces filtrations ont été faites de telle façon que la bougie fût toujours immergée de la même quantité dans les liquides.

Nous voyons donc qu'il suffit de se servir d'une bougie imprégnée d'albumine, pour avoir dès les premiers 5 ou 10 cc. un filtrat aussi actif que le filtrandum, et, ce qui est important, la bougie reste saturée d'albumine, la sucrase continuant à ne pas être retenue.

41. Action d'une très forte acidité sur la sucrase. —

Dans les expériences sur la filtration de la pepsine, j'ai démontré qu'à la neutralité à l'orangé, la diastase était retenue, mais qu'elle traversait la bougie si l'on ajoutait 2 pour 1000 de HCl.

En sera-t-il de même avec la sucrase de « l'*Aspergillus niger* ? » Cette diastase se prête particulièrement bien à cet examen, car contrairement aux autres diastases (je ne parle pas ici de la pepsine), elle supporte, comme je vais le montrer, une acidité énorme.

1° Acide acétique à 5 %. — J'ai déjà publié qu'en présence de 1 % d'acide acétique, la sucrase ne filtrait pas au travers des bougies Chamberland (1). Cette dose était peut-être insuffisante, aussi ai-je recommencé en présence de 5 % d'acide acétique. Mais encore faut-il se mettre en garde contre une neutralisation partielle de l'acidité de la solution par la bougie. Aussi ai-je commencé par aspirer 50 cc. d'eau acidulée par 5 % d'acide acétique. Ce n'est qu'alors que le mélange d'acide et de sucrase fut fait. La filtration eut lieu immédiatement et aussitôt le filtrat obtenu, on procéda à la neutralisation de l'acide et cela en même temps pour le filtrat et pour le filtrandum. Les résultats sont les suivants :

Sucrase	2 cc Fehling sont réduits par	Filtrabilité
non acidifiée	5 gouttes	
à 5 % ac. acétique	6	} 0 %
d° filtrée	> 180	
d° bouillie	> 180	

En tout la sucrase a été soumise à la forte réaction acide un peu moins de 10 minutes. Ce traitement ne l'a guère affaibli, mais il n'a pu la rendre plus filtrable qu'auparavant.

(1) MAURICE HOLDERER, C. R. 150, 790 (1910).

2° Action de HCl à 2 pour 1000. — La concentration en ions H d'une solution d'acide acétique à 5 % est assez faible, 10^{-2} environ, tandis qu'une solution de HCl à 2 pour 1000, c'est-à-dire M/18 donne une concentration en ions H d'environ 5×10^{-2} .

Une bougie contrôlée est lavée par de l'HCl à 2 pour 1000 (obtenu en étendant 1 cc de HCl à 22° B. avec de l'eau à 180 cc). Tout étant préparé, on dilue 1 cc. de HCl à 22° B. avec 5 cc d'eau dans un grand verre et on y ajoute rapidement 175 cc. de sucrase filtrée sur papier. Cette sucrase provient d'une macération de 24 heures à 34°; elle est donc très pauvre en sels. Etant donnée la quantité de HCl, il n'y a pas à tenir compte de la neutralisation partielle de l'acidité. On filtre et on recueille les portions successives 1, 2, 3 du filtrat de 18 cc, 19 cc et 30 cc. Le chiffre 0 représentant la portion non filtrée. Dès que les trois filtrats sont obtenus, on neutralise l'acide en même temps pour les 4 échantillons et l'on procède au dosage, mais en prenant 5 cc. de sucrase au lieu de deux pour le témoin non acidifié.

Sucrase		cc employés	2 cc. de Fehling	Filtrabilité
Non acidifiée	Volume du filtrat	au dosage	réduits par	
		2 cc	8 gouttes	
0 à 2°/00 HCL		5 cc	5 gouttes	
1 d° filtrée	18 cc	»	$\left. \begin{array}{l} > 120 \\ \text{à 40 gouttes} \\ \text{encore très} \end{array} \right\}$	0 %
2 » »	19	»		
3 » »	30	»		
bouillie		»	bleu.	

Même cette forte acidité a donc été impuissante à rendre la sucrase filtrable. La durée de la forte réaction acide a été de 7 minutes (à 4 ou 5 secondes près) la sucrase n'a été affaiblie que de 40 % pendant ce temps.

42. Généralisation de l'action de l'albumine à l'émulsine. —

Les résultats obtenus pour la sucrase, sont-ils aussi applicables aux autres diastases ? En collaboration avec M. G. BERTRAND, nous avons montré que l'émulsine était retenue à la neutralité au méthylorange (1). En présence du blanc d'œuf, pourra-t-elle filtrer à travers la bougie ?

(1) GABRIEL BERTRAND et MAURICE HOLDERER, *C. R.* **150**, 230 (1910).

On prépare 4 petits flacons contenant chacun le mélange suivant :

Amygdaline	0 gr. 5
Solution normale d'acétate de sodium	1 cc.
» » d'acide acétique	1 cc.

Dans deux de ces flacons, on verse 20 cc. de sucrase neutre au méthylorange non filtrée; au troisième, on ajoute la même diastase filtrée sur la bougie albumineuse précédemment décrite. Enfin le quatrième flacon recevra la diastase bouillie, puis tous les quatre sont placés au bain marie réglé à 56°.

Le premier flacon sert à se rendre compte de l'activité de la macération non filtrée. Comme après 4 heures, ce flacon ne contient pas encore beaucoup de HCN, on prolonge l'action. Après 9 heures 1/2 on retire les flacons et sur 10 cc. on dose le HCN.

Nature de la diastase	SO ⁴ Cu		HCN				Filtrabilité
	gouttes	cc	mgr	du à l'action diastasique			
				mgr	%		
Non filtrée	14 gouttes	0 8	8	6	50	92.5 %	
filtrée	17 »	0.95	9.5	6.5	54		
bouillie	4 »	0.2	2	0	0		

Comme la sucrase, l'émulsine a donc pu filtrer à la réaction 0, il a suffi d'aspirer auparavant un peu d'albumine acidifiée au travers de la bougie.

43. Conséquence : La sucrase est adsorbée. — Les expériences décrites plus haut démontrent nettement le mécanisme par lequel la sucrase et l'émulsine de « l'*Aspergillus niger* » sont retenus. Il ne peut être question dans mes expériences de diminution de grosseur des micelles : la réaction restait constante, de même les granules. On peut admettre la théorie de l'enrobage de BECHHOLD (Umhüllungs Theorie). Les micelles colloïdales entourées d'une couche d'albumine sont plus glissantes et peuvent traverser le filtre.

Il est plus naturel de dire qu'il se produit lors de la filtration

à la réaction neutre au méthylorange, une teinture de la bougie par les micelles du colloïde diastasique. En filtrant un très grand volume de liquide, on aurait saturation de la bougie, phénomène déjà connu pour bien des diastases ou des toxines et qui se manifeste surtout dans le fait que les liquides concentrés donnent des filtrats actifs.

Mais si nous venons à enduire, à teindre, les pores de la bougie avec du blanc d'œuf, à la même réaction, l'affinité des pores est saturée. Aussi observons-nous un passage intégral de la sucrase dans mes expériences. Ces diastases, quand elles sont retenues le sont donc par adsorption.

44. Filtrations successives. -- Cas de la zymase. — Toutes les diastases retenues lors de la filtration le sont-elles par un phénomène d'adsorption ? S'il en était ainsi, il suffirait de généraliser l'emploi de mes bougies albumineuses pour obtenir toujours des filtrats sans pertes d'activité.

Mais il y a des cas où cet artifice ne suffit pas et où l'état de dissolution des micelles intervient. Comment expliquer autrement les expériences de WILIBALD SCHMIDT (1) qui filtrait plusieurs fois une même solution de blanc d'œuf sur des membranes animales ? La filtrabilité (2) du blanc d'œuf était bien plus élevée pour les solutions déjà filtrées que pour le liquide initial, ce qui démontre bien un arrêt des grosses micelles par les premières membranes. Les filtrats ne contiennent plus que de très petites micelles, qui franchiront aisément les nouveaux filtres ; l'adsorption, au contraire, pourrait tout aussi bien avoir lieu encore, si elle intervenait.

Je citerai un autre argument tiré des expériences de BUCHNER (3) avec le suc de levure. Sur bougie Chamberland, la filtrabilité est presque nulle, au plus 18 % tandis qu'elle atteint 65 % par exemple pour une bougie Berkefeld ; BUCHNER explique tout par la finesse variable des pores des bougies, ne pensant pas à la réaction ni à la grosseur des micelles. Or, le filtrat prove-

(1) W. SCHMIDT, *Poggendorff's Annalen*, 99, 337-336 (1856) et **114**, 337-892 (1861).

(2) J'appelle filtrabilité d'une substance en solution le rapport de la richesse de la solution après filtration à celle avant cette filtration.

(3) E. et H. BUCHNER et HAHN. *Die Zymasegärung* (1903) Munich (1903) (chez Oldenburg).

nant d'une bougie Berkefeld est aspiré ensuite par BUCHNER à travers une bougie Chamberland. Cette deuxième filtration n'a pas affaibli la zymase. S'il y avait adsorption, elle aurait encore pu avoir lieu, donc l'arrêt s'est produit par une sorte de criblage, et pas ou presque pas par teinture. Ces filtrations ressemblent du reste beaucoup aux « ultrafiltrations » car la première bougie est toujours rapidement colmatée et la couche glaireuse qui l'entoure constitue un véritable filtre colloïdal. Peut-être une légère autodigestion pendant les premières filtrations intervient-elle aussi pour augmenter les filtrabilités ultérieures.

45. Pepsine. — Les bons résultats obtenus avec le blanc d'œuf sur la filtrabilité des diastases de « l'*Aspergillus Niger* », m'ont encouragé à vérifier le même procédé avec la pepsine. J'avais déjà observé l'effet très favorable de 1 % de $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$, à la réaction naturelle de la pepsine (1). Il fallait donc s'attendre à voir, pour la pepsine, incomplètement dissoute, la grosseur des micelles jouer le rôle prédominant.

Un blanc d'œuf, de 29 cc, est dilué avec 116 cc. d'eau, battu, tamisé et filtré sur papier Chardin en rejetant sur le filtre les premières portions qui passent trop rapidement. Le liquide ne sera recueilli qu'à partir du moment où il coulera goutte à goutte, puis acidifié légèrement au méthylorange.

Pendant ce temps on prépare 100 cc. d'une solution contenant 2 gr. de pepsine en paillettes (Billault, titre 100), qu'on neutralise au méthylorange et qu'on filtre sur papier Chardin, non mouillé.

On fait alors le mélange suivant (désigné par P+A) :

40 cc. de la solution de pepsine à 2 % et

40 cc. de la solution d'albumine diluée.

Ce mélange se trouble à nouveau ; on ne le filtre plus sur papier, mais directement à la bougie lavée à l'eau.

D'autre part on dilue le restant de la solution de pepsine de son volume d'eau pour en faire une solution à 1 %. C'est la solution de pepsine qui est filtrée sur une bougie à travers laquelle on a aspiré de l'albumine diluée à la neutralité à l'orangé.

(1) MAURICE HOLDERER, *C. R.* **150**, 790 (1910).

Puis 5 cc. des différents échantillons diastasiques sont ajoutés à 2 gr. de fibrine sèche et 50 cc. d'eau acidulée contenant 2,2 % de HCl. Ensuite on place les flacons avec 3 gouttes de toluène, au bain marie réglé à 52° pendant 4 heures. Les dosages sont faits sur 10 d'après la méthode de SOERENSEN.

Pepsine	Soude décinor- male due à l'action diastasique
P + Albumine	4.9 cc.
d filtrée	1.2
d bouillie	0.
Pepsine 1 %	4.8
d filtrée (bougie albumineuse)	0.
d bouillie	0.

La bougie albumineuse a donc totalement retenu la pepsine, non mélangée à l'albumine acidifiée, mais il semble qu'au moment du mélange, un peu de pepsine est passée à travers la bougie. Par quel mécanisme cette filtration s'est-elle produite ? Où bien, la solution d'albumine était trop acide et nous savons déjà que la pepsine, en présence d'un excès d'acide devient soluble, où bien il se sera produit un autre phénomène, signalé par HEDIN (1) à savoir la réversibilité des combinaisons d'adsorption de différentes substances avec les diastases. La pepsine fixée sur son support colloïdal, en présence de l'albumine pourrait être arrachée de son support et viendrait se fixer sur l'albumine. Cette dernière étant mieux dissoute entraînerait la pepsine à travers la bougie. Un effet d'arrachage de diastase a en effet été signalé par HEDIN pour la combinaison trypsine-noir animal. En filtrant sur papier la solution, le filtrat peut être inactif, mais en ajoutant la caséine directement à la combinaison trypsine-noir, la caséine est digérée partiellement. Comme dans ces questions le temps et la température interviennent beaucoup, il était naturel de procéder à la vérification suivante : mélanger la pepsine et l'albumine neutre au méthylorange, filtrer aussitôt une première portion, de façon à ce que la pepsine ne soit pas encore enlevée à son support : c'est le premier filtrat (2). Puis une autre portion est

(1) HEDIN, *Zeitsch. f. Physiol. Chem.* **50**, 497-507 (1907) et **52**, 412-424 (1907).

(2) Comme il importe d'avoir une filtration rapide, il est bon de se servir d'une solution de blanc d'œuf, déjà filtrée sur papier et sur bougie.

placée, avec deux gouttes de toluène pendant 3 heures à l'étuve à 34°, avant d'être filtrée, ce qui donne le deuxième filtrat. Enfin sur une autre portion du mélange on ajoute, avant filtration, 2 0/00 de HCl, ce qui solubilise totalement la pepsine et, après un séjour de 5 minutes à la température ordinaire, on neutralise l'acide ajouté : c'est le 3^e filtrat. Dans le tableau, je donne les chiffres de dosage des acides aminés. Les conditions d'expérience sont :

5 cc. de pepsine à 1 %, 2 gr. de fibrine sèche et 50 cc. de HCl à 2.2 0/00, pendant 3 heures à 49°.

Nature de la pepsine	NaOH décinormale		Filtrabilité
	Acides libres	Acides aminés	
1 bouillie	6.8	10 gouttes	0 %
1 ^{er} filtrat	7.3	12 »	6 %
2	7.5	11 »	3
3	7.3	13 »	10
Pepsine non filtrée	8.8	41 »	

Ce tableau semble indiquer que le phénomène de HEDIN se produit dans ce cas. Mais si l'on songe aux difficultés de dosage dans un liquide fortement trouble, et aux erreurs d'expériences atteignant 3 gouttes, on devra dire que pratiquement les 3 filtrats étaient inactifs : la fixation de la pepsine par l'albumine à la réaction neutre au méthylorange n'avait pas eu lieu et les résultats de l'expérience citée page 61 devaient être attribués peut-être à une trop forte acidité, ou, ce qui paraît plus probable, aux sels apportés par le blanc d'œuf.

CONCLUSIONS

J'ai étudié les conditions qui peuvent influencer la filtration des diastases sur la bougie Chamberland F.

La plus importante est la réaction du milieu.

A la neutralité à la phénolphtaléine, la plupart des diastases traversent la bougie. A la neutralité au méthylorange, les diastases sont en général retenues presque complètement lors de la filtration. Entre ces deux réactions, la filtrabilité des diastases est intermédiaires. Les diastases pour lesquelles j'ai constaté ces faits sont :

SUCRASE	de l' <i>Aspergillus niger</i>
EMULSINE	de la même moisissure
CELLASE	(En collaboration avec M. GAB. BERTRAND)
MALTASE	
AMYLASE	
DEXTRINASE	de la macération aqueuse du malt
PEROXYDIASTASE	
EMULSINE	produits commerciaux
PEPSINE	obtenus par précipitation avec l'alcool
TRYPSINE	
CATALASE	de la panne de porc.

La pepsine en poudre dissoute dans l'eau distillée à la concentration de 1 % environ, donne une solution presque neutre au méthylorange. Elle ne passe pas à travers la bougie dans ces conditions, mais il est possible de la rendre filtrable en ajoutant,

soit 1 % de sulfate d'ammonium, soit deux ou trois pour mille d'acide chlorhydrique.

D'après les résultats obtenus avec la pepsine, il n'était pas impossible de supposer que la neutralité au méthylorange constituerait la réaction la plus défavorable à la filtration et qu'après une augmentation suffisante de l'acidité, les diastases ne seraient plus retenues. En général, la vérification de cette hypothèse est impossible pour les diastases, presque toutes étant détruites à une réaction nettement acide au méthylorange. Seules, la pepsine et, au moins pour un temps de contact pas trop prolongé, la sucrase « d'*Aspergillus niger* », résistent à cette forte acidité. Or, à 1 et à 5 % d'acide acétique aussi bien qu'à 2 pour 1000 d'acide chlorhydrique, la sucrase, dont la solution est d'aspect parfaitement limpide, est également retenue par la bougie.

L'émulsine d'amandes douces, comme la papaine du suc desséché de « *Carica papaya* », en concentrations assez fortes, sont filtrables à toutes les réactions, mais cessent de l'être à concentrations plus faibles. Il arrive alors un moment où elles ne passent plus du tout, ou seulement à une réaction alcaline.

Par quel mécanisme s'est produit l'arrêt des diastases? Est-ce une sorte de criblage, ou un phénomène de teinture? L'étude de l'influence des agents coagulants et décoagulants, ainsi que de l'albumine, m'a permis de répondre que c'est surtout un phénomène d'adsorption, c'est-à-dire de teinture qui entre en ligne de compte. Cependant, pour les diastases mal dissoutes, ou qui se trouvent à l'état presque coagulé, il est évident que nous avons aussi un phénomène de criblage. Alors les agents dissolvants, tels le sulfate d'ammonium, favorisent la filtration.

Au contraire, pour la sucrase, l'addition d'albumine d'œuf, préalablement acidifiée et filtrée à la bougie, rend filtrable cette sucrase également acidifiée jusqu'à la même réaction (rose au méthylorange). Bien plus, une bougie sur laquelle on a filtré cette solution d'albumine, ne retient plus ni la sucrase ni l'émulsine de la macération acide d'*Aspergillus*. Un pour cent de peptone rend, de même, filtrable la sucrase acide, tandis que huit pour cent de NaCl n'ont pas empêché la filtration (il y aurait tout au plus un léger effet inverse).

L'effet de l'albumine est en contradiction avec les idées qui ont cours. On pensait que l'albumine empêcherait plutôt la filtration et voilà que cette même substance favorise le phénomène ! Or, l'albumine a été amenée au préalable à la même acidité que la solution diastasique. Il paraît donc peu probable qu'elle puisse provoquer un changement notable dans la grosseur des micelles; si l'albumine agit, ce serait que, fixée sur la bougie par un phénomène de teinture, elle empêcherait la diastase d'être retenue par le même mécanisme.

La macération prolongée, c'est-à-dire l'autodigestion, ne favorise nullement la filtrabilité de la sucrase.

On ne peut pas attribuer l'arrêt de la sucrase sur le filtre à un appauvrissement en sels, car l'addition à la sucrase filtrée de tous les sels de la solution originale, ne produit aucune activation.

La sucrase est donc retenue par adsorption et non par criblage. C'est le cas le plus fréquent. Les diastases se comportent donc comme les microbes. DUCLAUX, en effet, avait déjà observé la force d'adhésion qui retient les microbes. « Au regard de la dimension moyenne des spores, disait-il, les pores de la substance poreuse la plus fine sont comme des tunnels vis-à-vis des wagons ».

Comme applications déjà réalisées de mes recherches, je puis citer les suivantes :

1° Préparation de solutions diastasiques filtrées et cependant actives, en employant l'un des procédés décrits, à savoir : a) la filtration alcaline suivie de neutralisation par une solution stérile de HCl; b) l'emploi des bougies albumineuses, ou des solutions diastasiques concentrées ou encore additionnées d'albumine, peptone, sels ou acides.

2° Nous avons, M. Gab. BERTRAND et moi, découvert dans la macération d'*Aspergillus niger* une nouvelle diastase, la cellulase, dédoublant le cellulose en deux molécules de glucose. Nous avons pu, grâce à ma méthode, démontrer que ce dédoublement n'est pas dû à un reste de spores, mais bien à une diastase.

3° Ma méthode, en ne poussant pas trop loin l'alcalination, permettra d'étendre le procédé de séparation relative des dias-

tases par filtration. Ainsi avons-nous pu, M. Gab. BERTRAND et moi, démontrer la différence entre la cellase et l'émulsine.

4° L'extraction de la sucrase d'*Aspergillus niger* est rendue bien plus facile quand on alcalinise l'eau de macération. Pour alcaliniser, j'emploie, non pas de la soude, mais un sel alcalin, tel le phosphate trisodique qui constitue une réserve importante de base sans cependant donner une réaction par trop alcaline.

5° L'émulsine en poudre obtenue par précipitation alcoolique est toujours assez difficile à dissoudre. Pour avoir des filtrats actifs, il faudra en alcalinisant, dépasser la neutralité à la phénolphtaléine, en se conformant à la méthode indiquée page 33.

A part la pepsine, très affaiblie en milieu alcalin, je pense que les autres diastases en poudre se comporteront comme l'émulsine. On aura d'ailleurs probablement avantage à remplacer la soude par un sel alcalin (carbonate de sodium, phosphate trisodique, etc.).

Le présent travail suggère beaucoup d'études nouvelles. Comme j'ai toujours réussi à avoir des filtrats actifs, mes recherches permettront vraisemblablement de mettre au point la question si controversée de l'existence de certaines diastases, telles que la sucrase des pommes, l'uréase, la réductase, etc...

La séparation relative des diastases par filtration sera un moyen de plus pour résoudre certains problèmes. Ainsi, une macération d'*Aspergillus niger* ne contient-elle qu'une seule diastase capable de produire divers effets, ou y a-t-il un mélange de diverses diastases?

Les toxines étant vraisemblablement des corps au moins voisins des diastases, tout ce qui vient d'être dit pour les diastases doit pouvoir s'appliquer aux toxines.

Enfin, je citerai cette remarque : les spores « d'*Aspergillus niger* » sont retenues par une simple filtration sur papier en réaction neutre au méthylorange, tandis qu'à la neutralité à la phénolphtaléine, elles traversent le papier. Cette remarque suggère la pensée d'un travail semblable à celui-ci sur la filtrabilité des microbes à diverses réactions. C'est une question que je me propose d'étudier.

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Théories des Colloïdes.

Vu et approuvé :

Paris, le 3 juin 1911

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

PAUL APPELL.

Vu et permis d'imprimer :

Paris, le 3 juin 1911.

LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS

L. LIARD.

